

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA**



**PÃO COM ELEVADO TEOR EM AMIDO RESISTENTE:  
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E ESTUDO *IN VIVO***

***Olga Maria Reis Pacheco de Amaral***

Orientadora: Prof. Doutora Catarina Ferreira Murinello de Sousa Guerreiro Fragoso Mendes

Co-Orientadora: Prof. Doutora Marília Lopes Cravo

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor  
**Programa Doutoral de Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar**  
**Ramo Ciências e Tecnologias da Saúde**  
Especialidade em Nutrição

**2016**



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA**



**PÃO COM ELEVADO TEOR EM AMIDO RESISTENTE:  
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E ESTUDO *IN VIVO***

***Olga Maria Reis Pacheco de Amaral***

Orientadora: Prof. Doutora Catarina Ferreira Murinello de Sousa Guerreiro Fragoso Mendes

Co-Orientadora: Prof. Doutora Marília Lopes Cravo

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor

**Programa Doutoral de Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar**

**Ramo Ciências e Tecnologias da Saúde, Especialidade em Nutrição**

**Júri**

**Presidente:** Doutor José Luís Bliebernicht Ducla Soares, Professor Catedrático em regime de *tenure* da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

**Vogais:**

Doutora Ana Maria Pereira Gomes, Professora Auxiliar da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Doutora Cláudia Alexandra Colaço Lourenço Viegas, Professora Adjunta da Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril

Doutora Maria do Rosário Beja de Figueiredo Gonzaga Bronze, Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade Lisboa

Doutora Maria Isabel Augusta Cortes do Carmo, Professora Associada Convidada com Agregação Aposentada da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Doutora Marília Lopes Cravo, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (*co-Orientadora*)

Doutora Catarina Ferreira Murinello de Sousa Guerreiro Fragoso Mendes, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (*Orientadora*)

As opiniões expressas nesta publicação são da exclusiva responsabilidade do seu autor.

***A impressão desta tese foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade  
de Medicina de Lisboa em reunião de 24 de Maio de 2016***

## **RESUMO**

As doenças crónicas não transmissíveis – obesidade, diabetes *mellitus*, doença cardiovascular, hipertensão, acidente vascular cerebral e alguns tipos de cancro – tornaram-se as causas mais frequentes de morbilidade e mortalidade não só dos países desenvolvidos como dos países em desenvolvimento. Estas doenças resultam, em grande parte, de alterações marcadas no estilo de vida onde se inclui a alimentação e o sedentarismo. O consumo de alimentos funcionais, por apresentarem para além do óbvio interesse nutricional algum benefício fisiológico para a saúde, são considerados como um possível complemento à prática de uma alimentação saudável.

Neste âmbito, o amido resistente (AR), definido como a soma do amido e produtos da sua degradação não absorvidos no intestino delgado, tem sido alvo de interesse por parte da comunidade científica pelas suas propriedades funcionais. Têm-lhe sido atribuídos benefícios fisiológicos, especialmente em patologias como: doenças intestinais, diabetes, doença cardiovascular, dislipidémias, obesidade e osteoporose.

O pão é um dos alimentos base e uma das mais importantes fontes de hidratos de carbono da dieta dos portugueses. Contém pequenas quantidades de AR mas, de acordo com alguns estudos, é possível fomentar a sua formação durante o processo de fabrico introduzindo alterações na fórmula, condições de cozedura e conservação. Os resultados dos trabalhos publicados neste tema nem sempre são concordantes nas suas conclusões além de que a metodologia de quantificação do AR utilizada dificulta a sua comparação.

O conjunto dos trabalhos que compõem esta tese pretende estudar o efeito da ingestão de pão com elevado teor em AR, desenvolvido por otimização do processo de fabrico, nas respostas glicémica e insulínica e na saciedade de indivíduos não diabéticos.

Na primeira fase do trabalho foi estudado o efeito de alguns fatores na formação de AR durante o processo de fabrico do pão, nomeadamente a fórmula (maior ou menor teor de água na massa, adição de farinha de espelta, adição de ácido láctico e adição de “massa azeda”), o tamanho do pão (35, 70, 140 e 400 g), as condições de cozedura (200°C/30 minutos, 150°C/3 h e 120°C/4 h) e as condições de conservação (temperatura ambiente, 4°C e -20°C durante 1, 3, 5 e 7 dias).

A segunda fase consistiu em conjugar as variantes identificadas no estudo anterior que contribuem positivamente para a formação de AR numa única formulação de pão – pão com elevado teor em AR (PAR).

Seguiu-se um estudo experimental, *in vivo*, que consistiu num ensaio cruzado em ocultação simples e com ingestão única. Neste estudo participaram 37 voluntários não diabéticos e foram testados o pão PAR anteriormente desenvolvido e um pão controlo (REF). Foram monitorizadas a glicémia capilar em jejum e aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos e a insulinémia em jejum e aos 30 minutos. Em simultâneo com a monitorização da glicémia, os voluntários foram convocados a preencher uma escala visual analógica para avaliação da sensação de apetite/saciedade.

Por último foi determinado o Índice Glicémico do pão PAR e do pão REF.

Os resultados da primeira fase do trabalho permitiram concluir que é possível aumentar significativamente o teor de AR do pão de trigo: aumentando o teor de humidade da massa (1,4 farinha:1,0 água); preparando pães de tamanho maior em vez de doses unitárias, submetendo-o a cozedura prolongada a baixa temperatura e conservando o pão à temperatura ambiente durante 3 dias.

A formulação de pão PAR desenvolvida, consiste num pão de  $\approx 400$  g preparado com uma proporção de 1,4 farinha:1,0 água com substituição de 20% de farinha de trigo por farinha de milho e submetido a cozedura a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 7 h. Este pão apresenta um teor de AR de 2,4%. O pão REF (porção unitária de  $\approx 70$  g) foi produzido de acordo com a metodologia tradicional de fabrico: proporção de 1,6 farinha:1,0 água, exclusivamente com farinha de trigo, submetido a cozedura a  $200^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Apresenta um teor de AR de 0,8%.

O ensaio *in vivo* realizado permitiu concluir que a resposta glicémica ao pão PAR é significativamente inferior relativamente ao pão controlo: foram observados valores da glicémia aos 60, 90 e 120 minutos significativamente mais baixos no caso do pão PAR; a resposta glicémica expressa em área incremental abaixo da curva (AUC) apresentou valores significativamente mais baixos para o pão PAR ( $127,15 \text{ mmol} \cdot \text{min}/\text{l}$ ) que para o pão REF ( $153,77 \text{ mmol} \cdot \text{min}/\text{l}$ ), ingeridos em doses equivalentes de HC disponíveis. Estas observações permitem sugerir que o AR influencia a digestibilidade da fração de amido disponível e que são observados efeitos benéficos com um teor de 2,4% de AR.

A resposta insulínica não apresentou diferenças significativas entre os dois pães testados até aos 30 min.

O pão PAR induziu maior saciedade que o pão REF, sendo previsível que numa situação *ad libitum*, a quantidade ingerida de pão PAR seria inferior.

O IG do pão PAR apresentou um valor de 60 correspondendo a um alimento de médio IG enquanto o pão REF revelou um valor de 82 (elevado IG).

O AR revela-se uma substância com elevado interesse nutricional devido aos efeitos fisiológicos benéficos que apresenta. A alteração do teor de AR no pão de 0,8 para 2,4% poderá traduzir-se em benefícios para a saúde e a formulação desenvolvida poderá constituir uma boa escolha alimentar no contexto de uma alimentação saudável para indivíduos não diabéticos.

**Palavras-chave:** amido resistente, pão, resposta glicémica, saciedade, índice glicémico





## **ABSTRACT**

Noncommunicable chronic diseases - obesity, diabetes mellitus, cardiovascular disease, hypertension, stroke and some cancers - have become the most frequent causes of morbidity and mortality not only in developed as well as in developing countries. These diseases result largely from marked changes in lifestyle including those of diet and physical inactivity. The consumption of functional foods might have physiological improvement to health beyond the obvious nutritional benefit and, therefore, is considered as a possible complement to the practice of a healthy diet.

In this context, resistant starch (RS), defined as the sum of starch and its degradation products not absorbed in the small intestine, has been object of interest from the scientific community for its functional properties. It has been assigned physiological benefits, especially in diseases such as: intestinal diseases, diabetes, cardiovascular disease, dislipidaemia, obesity and osteoporosis.

Bread is a basic foodstuff and one of the most important sources of carbohydrates in the Portuguese diet. It contains small quantities of RS, but, according to some studies, it is possible to promote its formation during the manufacturing process by introducing changes in formula, baking and storage conditions. The results of the published studies in this subject are not always consistent in their conclusions, moreover, the RS quantification methodology used makes it difficult to compare them.

The set of studies included in this thesis aim to analyse the effect of the intake of bread with high amount of RS, developed by optimization of the manufacturing process, on glucose and insulin responses and on the satiety of non-diabetic individuals.

In the first part of this thesis, we studied the effect of several variables in the formation of RS during the manufacturing process of bread was studied, namely: the formula (higher or lower water content in the dough, addition of spelt flour, addition of lactic acid and addition of sourdough), the loaf size (35, 70, 140 and 400 g), baking conditions (200°C/30 minutes, 150°C/3 h and 120°C/4 h) and storage conditions (room temperature, 4°C and -20°C for 1, 3, 5 and 7 days).

The second part consisted of combining the variables identified in the previous study, which positively contribute to the formation of RS in bread, in a single formulation - bread with a high amount of RS (PAR).

This was followed by an experimental *in vivo* study, which consisted of a single-blind, single ingestion crossover trial. In this part of the study we had the participation of 37 non-diabetic volunteers who tried the PAR bread previously developed and a control bread (REF). Capillary fasting blood glucose levels and those at 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes were monitored, as well as insulin levels – at fasting and after 30 minutes. Simultaneously with the monitoring of blood glucose, the volunteers were asked to fill in a visual analogue scale in order to assess the appetite sensation/satiation feeling.

Lastly, the Glycaemic Index of the PAR bread and REF bread was determined.

The results obtained in the first part of the study indicate that it is possible to significantly increase the RS content of wheat bread by: increasing the content of water in the dough (flour 1.4: 1.0 water); preparing large size rolls instead of unit doses; baking at long time-low temperature and keeping the bread at room temperature for 3 days.

The developed PAR bread formulation, consisting of a 400 g bread prepared with a flour to water ratio of 1.4:1.0, replacing 20% of wheat flour for corn flour and baking at 120°C for 7 h. This bread has an RS content of 2.4%. The REF bread (single serving of 70 g) was produced according to the traditional manufacturing method: a flour to water ratio of 1.6:1.0, exclusively with wheat flour and baking at 200°C for 30 minutes. It features an RS content of 0.8%.

The *in vivo* test showed that the glycaemic response to PAR bread is significantly lower in relation to control bread: the observed blood glucose values at 60, 90 and 120 minutes were significantly lower in the case of PAR bread; the glycaemic response expressed in incremental area under the curve (AUC) showed significantly lower values for the PAR bread (127.15 mmol \* min / l) than for the REF bread (153.77 mmol \* min / l) taken in equivalent doses of available carbohydrates. These observations suggest that RS influences the digestibility of available starch fractions and those potentially beneficial effects are observed with a 2.4% content of RS.

The insulin response showed no significant differences between the two breads tested up to 30 minutes.

The PAR bread induced greater satiety than REF bread, which can lead to the prediction that, in an *ad libitum* situation, the amount of PAR bread ingested would be lower.

The PAR bread presented a GI value of 60, matching a medium GI foodstuff while the REF bread showed a value of 82 (high GI).

RS appears to be a substance with a high nutritional value which may have beneficial physiological effects. Changing the RS content in bread from 0.8 to 2.4% has resulted in clear health benefits. Thus, the developed bread formulation may constitute a good food choice in the context of a healthy diet for non-diabetic individuals.

**Keywords:** resistant starch, bread, glycaemic response, satiety, glycaemic index



## ÍNDICE

RESUMO.....	I
ABSTRACT .....	V
ÍNDICE.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS .....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIII
<b>1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>1</b>
1.1. Introdução .....	1
1.2. Amido .....	4
1.3. Amido resistente .....	5
1.4. Fontes alimentares de amido resistente .....	7
1.5. Fatores que influenciam o teor de amido resistente nos alimentos .....	11
1.6. Benefícios fisiológicos do consumo de amido resistente .....	13
1.6.1. Doenças intestinais.....	14
1.6.2. Metabolismo da glicose .....	16
1.6.3. Metabolismo lipídico .....	19
1.6.4. Perda e manutenção de peso.....	19
1.6.5. Absorção de sais minerais.....	23
1.7. O amido resistente como componente da dieta.....	23
1.8. Aplicações do amido resistente .....	24
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>30</b>
3.1. Efeito da fórmula, do tamanho do pão, da cozedura e das condições de conservação na formação de amido resistente no pão de trigo .....	30
3.1.1. Materiais e equipamentos .....	30
3.1.2. Preparação de amostras .....	30
3.1.3. Determinações analíticas.....	32
3.2. Desenvolvimento de um pão com elevado teor em amido resistente.....	34
3.2.1. Materiais e equipamentos .....	34
3.2.2. Preparação de amostras .....	34
3.2.3. Determinações analíticas.....	35
3.3. Efeito da ingestão de pão com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica e insulínica e na saciedade de indivíduos não diabéticos.....	36
3.3.1. População do estudo .....	36
3.3.2. Desenho do estudo.....	38
3.4. Determinação do Índice Glicémico do pão com elevado teor em amido resistente e do pão de controlo .....	40
3.5. Tratamento estatístico .....	41
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
4.1. Efeito da fórmula, do tamanho do pão, da cozedura e das condições de conservação na formação de amido resistente no pão de trigo .....	42
4.1.1. Influência da formulação .....	42

4.1.2.	Influência do tamanho do pão e das condições de cozedura.....	43
4.1.3.	Influência das condições de conservação.....	44
4.2.	Desenvolvimento de um pão com elevado teor em amido resistente .....	45
4.3.	Efeito da ingestão de pão com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica e insulínica e na saciedade de indivíduos não diabéticos .....	46
4.3.1.	Caracterização da população do estudo .....	46
4.3.2.	Resposta glicémica.....	47
4.3.3.	Resposta insulínica.....	52
4.3.4.	Perceção da saciedade .....	53
4.4.	Determinação do Índice Glicémico do pão com elevado teor em amido resistente e do pão de controlo.....	57
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
5.1.	Efeito da fórmula, do tamanho do pão, da cozedura e das condições de conservação na formação de amido resistente no pão de trigo.....	59
5.1.1.	Influência da formulação.....	59
5.1.2.	Influência do tamanho do pão e das condições de cozedura.....	61
5.1.3.	Influência das condições de conservação.....	63
5.2.	Desenvolvimento de um pão com elevado teor em amido resistente .....	64
5.3.	Efeito da ingestão de pão com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica, insulínica e na saciedade de indivíduos não diabéticos .....	67
5.3.1.	Resposta glicémica.....	68
5.3.2.	Resposta insulínica.....	69
5.3.3.	Perceção da saciedade .....	70
5.4.	Determinação do Índice Glicémico do pão com elevado teor em amido resistente e do pão de controlo.....	72
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>77</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
	AGRADECIMENTOS .....	95
	APÊNDICE 1 .....	97
	APÊNDICE 2 .....	101
	APÊNDICE 3 .....	102
	APÊNDICE 4 .....	105
	APÊNDICE 5 .....	106
	ANEXO 1.....	107

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Caracterização dos HC mais comuns com base na sua composição química e na sua biodisponibilidade.....	3
<b>Tabela 2</b> – Conteúdo de amido total e AR de algumas fontes alimentares (g/100 g de alimento) .....	8
<b>Tabela 3</b> – Fórmula base (REF) e variantes testadas, relativamente à razão farinha:água (AGI e AGS), substituição parcial de farinha de trigo por farinha de espelta (E25 e E50), adição de ácido láctico (AL) e adição de massa azeda (MA) .....	30
<b>Tabela 4</b> – Fórmula base (REF) e diferentes condições testadas relativamente a tamanho do pão (P35, P140 e P400) e condições de cozedura (T150 e T120) .....	32
<b>Tabela 5</b> – Condições de conservação (temperatura / tempo) testadas a partir da fórmula base .....	32
<b>Tabela 6</b> – Fórmulas de pão com elevado teor em AR .....	35
<b>Tabela 7</b> – Esquema de recolha de dados no ensaio <i>in vivo</i> .....	38
<b>Tabela 8</b> – Teor de humidade e de AR das diferentes fórmulas de pão testadas .....	42
<b>Tabela 9</b> – Teor de humidade e de AR nos diferentes tamanhos de pão e condições de cozedura.....	43
<b>Tabela 10</b> – Teor de AR (g/100 peso seco) após diferentes condições de conservação.....	45
<b>Tabela 11</b> – Teor de humidade e de AR nas amostras de pão com elevado teor de AR.....	46
<b>Tabela 12</b> – Teor em proteína, gordura, HC e AR do pão PAR e do pão REF (g/100 g de pão) .....	46
<b>Tabela 13</b> – Valores médios da glicémia (mmol/l) em jejum e após ingestão das amostras (REF e PAR) por grupo de indivíduos do estudo (N – normoponderais; E - excesso de peso/obesidade).....	48
<b>Tabela 14</b> – Valores médios da glicémia (mmol/l) em jejum e após ingestão das amostras (REF e PAR) para o conjunto dos indivíduos do estudo .....	50
<b>Tabela 15</b> – Valores médios da AUC da glicémia (mmol*min/l) após ingestão das amostras (REF e PAR) por grupo (N – normoponderais; E - excesso de peso/obesidade) e para o conjunto dos indivíduos do estudo.....	51
<b>Tabela 16</b> – Valores médios da insulina (mUI/l) em jejum, 30 min após ingestão das amostras (REF e PAR) e incremento (30-0) por grupo de indivíduos do estudo (N – normoponderais; E - excesso de peso/obesidade) .....	52
<b>Tabela 17</b> – Valores médios da AUC (mm*min) dos parâmetros de avaliação da perceção de saciedade após ingestão das amostras (REF e PAR) .....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Efeito do tempo (entre 0 e 7 dias) e da temperatura de conservação (temperatura ambiente, 4°C e -20°C) no teor de AR.....	44
<b>Figura 2</b> – Caracterização dos voluntários por IMC ( $N < 25,0$ ; $E \geq 25,0$ ), gênero e faixa etária .....	47
<b>Figura 3</b> – Incremento da glicemia pós-prandial após a ingestão do pão REF e do pão PAR nos indivíduos normoponderais (grupo N) .....	48
<b>Figura 4</b> – Incremento da glicemia pós-prandial após a ingestão do pão REF e do pão PAR nos indivíduos com excesso de peso/obesidade (grupo E).....	49
<b>Figura 5</b> – Incremento da glicemia pós-prandial após a ingestão do pão REF e do pão PAR para o conjunto dos indivíduos do estudo .....	50
<b>Figura 6</b> – AUC média após ingestão das duas amostras (REF e PAR) para o conjunto dos indivíduos .....	52
<b>Figura 7</b> – Insulinemia média em jejum, pós-prandial aos 30 min e incremento entre as duas avaliações após ingestão das duas amostras (REF e PAR).....	53
<b>Figura 8</b> – Percepção da saciedade relativamente aos 4 parâmetros avaliados para as duas amostras (REF e PAR) .....	54
<b>Figura 9</b> – AUC média de cada parâmetro de avaliação da saciedade para as duas amostras (REF e PAR) ....	55
<b>Figura 10</b> – Relação dos valores médios de cada um dos parâmetros de avaliação da percepção de saciedade com o valor em jejum (0) para as duas amostras em estudo (REF e PAR) .....	56
<b>Figura 11</b> – Diagrama de extremos e quartis dos valores de AUC das amostras (REF e PAR) e do alimento de referência.....	57



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AACC</b>	<i>American Association of Cereal Chemists</i>
<b>AGCC</b>	Ácidos gordos de cadeia curta
<b>AGI</b>	Teor de água inferior
<b>AGS</b>	Teor de água superior
<b>AL</b>	Ácido láctico
<b>AOAC</b>	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
<b>AR</b>	Amido resistente
<b>AUC</b>	Área incremental abaixo da curva
<b>CCR</b>	Cancro colorctal
<b>CG</b>	Carga Glicémica
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>E</b>	Excesso de peso e obesidade
<b>E25</b>	25% de farinha de espelta
<b>E50</b>	50% de farinha de espelta
<b>EFSA</b>	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
<b>g</b>	grama
<b>GLP-1</b>	Peptídeo 1 semelhante à glucagina
<b>h</b>	hora
<b>HC</b>	Hidratos de carbono
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidade
<b>IG</b>	Índice glicémico
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization
<b>kg</b>	kilograma
<b>kJ</b>	kilojoule
<b>l</b>	litro
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baixa densidade
<b>M</b>	molar
<b>m</b>	metro
<b>MA</b>	Massa azeda
<b>mg</b>	miligrama
<b>min</b>	minuto
<b>ml</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mmol</b>	milimole

<b>mUI</b>	mili Unidades Internacionais (1 UI = 41 µg)
<b>N</b>	Normoponderais
<b>nm</b>	nanometro
<b>NP</b>	Norma Portuguesa
<b>°C</b>	Graus Celcius
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>P140</b>	Pão com 140 g
<b>P35</b>	Pão com 35 g
<b>P400</b>	Pão com 400 g
<b>PAR</b>	Fórmula com elevado teor em amido resistente
<b>QR</b>	Quociente respiratório
<b>REF</b>	Fórmula base
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>T120</b>	Cozedura a 120°C durante 4 h
<b>T150</b>	Cozedura a 150°C durante 3 h
<b>v/v</b>	volume por volume
<b>VAS</b>	Escala visual analógica
<b>wt%</b>	Percentagem em peso
<b>µl</b>	microlitro

## **1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **1.1. Introdução**

Nas últimas décadas verificaram-se acentuadas alterações no padrão alimentar e no estilo de vida no mundo ocidental decorrentes de mudanças importantes como a industrialização, a urbanização e o desenvolvimento económico dos mercados globais. Nos países mais marcados por estes fenómenos, as doenças crónicas não transmissíveis – obesidade, diabetes *mellitus*, doença cardiovascular, hipertensão, acidente vascular cerebral e alguns tipos de cancro – tornaram-se as causas mais frequentes de morbilidade e mortalidade (1). O padrão alimentar das populações destes países caracteriza-se pelo consumo reduzido de fibra e cereais integrais, pelo elevado consumo de hidratos de carbono simples e refinados e ainda pela ingestão elevada de alimentos de origem animal e gorduras hidrogenadas.

Simultaneamente os indivíduos apresentam-se mais sedentários não só na atividade de profissional como nas atividades domésticas e de lazer, traduzindo-se num decréscimo significativo do dispêndio energético (2). Acresce ainda que o consumidor atual é normalmente um indivíduo bastante ocupado com um ritmo de vida que lhe deixa pouco tempo para se preocupar com a alimentação e que, por estas razões, demonstra um grande interesse por alimentos de conveniência e rápida preparação. Contudo, este indivíduo sedentário e atarefado reconhece na alimentação um fator determinante da saúde e está consciente de que excessos, carências e desequilíbrios influenciam a qualidade e esperança de vida. É atualmente aceite que a alimentação não representa apenas um veículo de nutrientes e que certos alimentos parecem constituir fatores de proteção adicional ao desenvolvimento de doenças – os designados alimentos funcionais. Estes alimentos, para além de satisfazerem as necessidades nutricionais básicas, contêm uma ou mais substâncias fisiologicamente ativas que, em quantidades adequadas, podem promover a saúde e bem-estar e reduzir o risco de doença (3).

A indústria alimentar encontra neste ambiente uma oportunidade de desenvolver novos produtos, recorrendo a novas tecnologias e novos ingredientes. No entanto, é necessária uma verdadeira parceria entre as instituições responsáveis pela saúde das popu-

lações e a indústria alimentar para que se caminhe para soluções convergentes, com objetivos comuns, que contribuam para ultrapassar os problemas decorrentes de uma alimentação desequilibrada como a obesidade e outras doenças crónicas (4). A Organização Mundial de Saúde (OMS), no seu Plano de Ação 2008-2013 da Estratégia Mundial para a Prevenção e Controlo das Doenças não Transmissíveis alertou e reforçou a importância da promoção de uma dieta saudável em parceria com a indústria alimentar (5).

A obesidade e o excesso de peso são o quinto principal fator de risco de mortalidade a nível mundial, tendo sido designado pela OMS como a “epidemia do século XXI”. Por esse motivo, e com o objetivo de controlar esta ocorrência, a OMS recomenda a limitação da ingestão energética proveniente das gorduras e dos açúcares, o aumento do consumo de frutas e verduras, assim como de leguminosas, cereais integrais e frutos oleaginosos e a realização de prática de atividade física regular (60 min diários para os jovens e 150 min semanais para os adultos). Salienta ainda a importância da indústria alimentar na promoção de uma alimentação saudável através da redução do conteúdo em gordura, açúcar e sal nos alimentos processados e da disponibilização física e económica a todos os consumidores de alimentos são e nutritivos (6).

É hoje consensual entre os profissionais de saúde, que o aumento da ingestão de fibra na alimentação, alcançado pelo consumo de frutas, verduras, legumes e cereais integrais é uma das formas mais adequadas de controlar o peso e obter benefícios para a saúde. A OMS refere a diminuição do risco de obesidade e a provável diminuição do risco de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares decorrentes do aumento da ingestão de fibra alimentar e cereais integrais (1).

A fibra alimentar é um conjunto heterogéneo de compostos, de difícil quantificação analítica, incluídos no grupo dos hidratos de carbono (HC) (7). Os HC apresentam propriedades físicas e fisiológicas muito variadas pelo que a sua terminologia, classificação e caracterização nutricional é complexa e tem originado diversas controvérsias e discussões junto da comunidade científica (7-11). A classificação dos HC requer uma abordagem sistemática que tenha em conta as suas propriedades químicas mas também as suas características nutricionais e funcionais (10).

Cummings propôs uma abordagem química, sugerindo a classificação dos HC em três classes distintas. A primeira, genericamente designada de açúcares, inclui os monossacarídeos (glicose, frutose e galactose); os dissacarídeos, que consistem na ligação cova-

lente de dois monossacarídeos (sacarose, lactose e maltose) e os polióis que resultam da hidrogenação de mono e dissacarídeos (sorbitol, maltitol, lactitol). A segunda classe, dos oligossacarídeos, é constituída por HC de cadeia curta (3 a 9 unidades de monossacarídeos). Subdivide-se em dois grupos: maltodextrinas e oligossacarídeos não digeríveis (rafinose, estaquiose, fruto- e galato-oligossacarídeos e inulina). A terceira e última classe, os polissacarídeos, inclui polímeros com 10 ou mais unidades de monossacarídeos. Subdivide-se em amido e polissacarídeos não-amiláceos (celulose, pectina, gomas, mucilagens e hidrocoloides (8, 9).

Esta classificação com base na composição química constitui um suporte prático muito útil para a quantificação dos diferentes HC mas não fornece informação sobre o valor nutricional e os efeitos fisiológicos dos diferentes componentes (10, 12). Neste sentido, foi proposta uma outra classificação que conjuga a classificação química com a biodisponibilidade e o valor nutricional dos HC - Tabela 1.

**Tabela 1** – Caracterização dos HC mais comuns com base na sua composição química e na sua biodisponibilidade

<b>Categorias</b>	<b>Monossacarídeos GP 1</b>	<b>Dissacarídeos GP 2</b>	<b>Oligossacarídeos GP 3-9</b>	<b>Polissacarídeos GP&gt;9</b>
<b>HC disponíveis</b>	<b>Hexoses</b> <i>glicose</i> <i>frutose</i>	<b>Açúcares</b> <i>lactose</i> <i>sacarose</i>	<i>maltodextrinas</i> (resultantes da hidrólise parcial do amido)	<i>amido</i>
	<b>Polióis</b> <i>sorbitol</i> <i>manitol</i> <i>xilitol</i>	<b>Polióis</b> <i>maltitol</i> <i>lactitol</i>		
<b>HC resistentes</b>	<b>Pentoses</b> <i>xilose</i> <i>ribose</i>		<i>inulina</i> <i>fruto-oligossacáridos</i> <i>galato-oligossacáridos</i> <i>rafinose</i> <i>estaquiose</i>	<i>amido resistente</i>
				<b>Polissacarídeos não amiláceos</b> <i>celulose</i> <i>β-glucano</i> <i>pectina</i> <i>alginato</i> <i>quitosano</i>

GP – grau de polimerização

Fonte: Adaptado de (7)

A definição de fibra alimentar foi sofrendo modificações, especialmente na última década, relacionadas com o reconhecimento e a identificação de substâncias com propriedades fisiológicas comuns a este grupo nutricional. A definição mais recente inclui todos

os polissacarídeos não digeridos nem absorvidos pelo intestino delgado humano que pertencem a uma das seguintes categorias: (i) presentes naturalmente nos alimentos; (ii) extraídos de produtos alimentares por processos físicos, enzimáticos ou químicos; (iii) obtidos por síntese. Refere ainda que deve existir evidência científica que comprove os efeitos fisiológicos benéficos destes compostos para a saúde dos indivíduos (13). Esta definição foi estabelecida pela Comissão do *Codex Alimentarius* (programa conjunto da FAO e OMS). A Comissão Europeia decidiu incluir também os oligossacáridos resistentes, na definição de fibra alimentar (14).

## 1.2. Amido

O amido encontra-se presente nos alimentos de origem vegetal, sendo abundante em grãos de cereais, raízes e tubérculos, que dependem deste composto para o seu crescimento e reprodução. É também a principal fonte de energia para os animais, incluindo o Homem e o principal responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados. Nas plantas, o amido apresenta-se sob a forma de grânulos insolúveis que em contacto com a água aumentam de volume. Por aquecimento do amido hidratado (50 a 70°C) ocorrem alterações irreversíveis – gelatinização do amido (15).

Do ponto de vista químico, o amido é um polissacarídeo composto por unidades de glicose ( $\alpha$ -D-glicopiranosil) unidas por ligações  $\alpha(1-4)$  e/ou  $\alpha(1-6)$ . Pode organizar-se em dois tipos de estruturas: a amilose, que consiste em cadeias lineares  $\alpha(1-4)$  de aproximadamente 1000 unidades; e a amilopectina que é constituída por cadeias lineares  $\alpha(1-4)$  com ramificações  $\alpha(1-6)$  e que pode chegar a 4000 unidades de glicose. A amilose e a amilopectina encontram-se em proporção variável nos grânulos de amido das diferentes espécies. De uma forma geral, a amilopectina é o maior componente, enquanto a amilose constitui entre 15 a 30% do teor de amido total. Quando ocorre a gelatinização do amido (aquecimento em meio aquoso) o grânulo absorve água (20 a 40 g água/g amido), aumenta de volume e parte da amilose difunde-se do interior do grânulo para a solução. Finalmente dá-se a rutura da estrutura granular resultando uma solução de amilose e amilopectina que apresenta uma consistência de pasta visco-elástica (15).

A digestão do amido inicia-se na boca através da amilase salivar e completa-se no intestino delgado dando origem a moléculas de glicose que aí são absorvidas. Antes da década de 80, era assumido que todo o amido era hidrolisado e absorvido no intestino delgado. Estudos realizados para desenvolver um método de doseamento *in vitro* de polissacarídeos não amiláceos revelaram que uma parte do amido ingerido não é hidrolisada e resiste ao processo digestivo. Esta fração denominou-se **Amido Resistente** (AR) (16, 17). Os fatores que definem a digestibilidade do amido num alimento incluem a sua origem botânica, a relação amilose/amilopectina, a estrutura do grânulo, as características físicas do alimento e o tipo de processamento, assim como a presença de outros nutrientes e substâncias não nutritivas (18-21). Desta forma, os alimentos amiláceos podem conter (22):

- **amido rapidamente digerível**, hidrolisado no intestino delgado originando glicose em cerca de 20 min (alimentos sujeitos a tratamento térmico na presença de água – amido gelatinizado);
- **amido de digestibilidade lenta**, completamente hidrolisado no intestino delgado entre 20 e 110 min (alimentos cujo amido não está facilmente acessível ou não ocorreu a sua completa gelatinização);
- **amido resistente**, não é hidrolisado após 120 min, sendo, no entanto, fermentado pela microbiota intestinal com benefícios para a saúde.

Esta última fração do amido foi alvo de vários estudos tendo sido definido como “*a soma do amido e produtos da sua degradação não absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis*” (23).

### **1.3. Amido resistente**

As substâncias incluídas na definição de AR atingem o cólon, constituindo-se substrato fermentativo para a microbiota intestinal. Os produtos finais da fermentação são hidrogénio, dióxido de carbono, metano e ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), estes últimos absorvidos e utilizados pelo organismo humano. Contudo, a energia fornecida por estes ácidos gordos é muito inferior à resultante da digestão do amido no intestino delgado (23). O amido fornece 15 kJ/g, enquanto 1 g de AR fornece apenas 8 kJ (24). Devido

a estas características o AR demonstra possuir benefícios fisiológicos similares às fibras solúveis comportando-se como prebiótico.

Prebióticos são substâncias que não são digeridas mas que têm efeitos benéficos por estimularem o crescimento e/ou a atividade de algumas bactérias específicas da flora intestinal promovendo a saúde do hospedeiro (25). A questão da especificidade é importante na medida em que os prebióticos apenas devem fomentar o crescimento e a atividade das bactérias benéficas já presentes no cólon (26).

O AR divide-se em cinco categorias (AR1-AR5), de acordo com as diferentes características que lhe permitem a resistência à hidrólise (23, 27-29):

- O **AR1** inclui o amido que resiste à digestão porque é fisicamente inacessível na matriz do alimento. Encontra-se em estruturas vegetais parcialmente inteiras ou mal moídas como grãos e sementes. As leguminosas são também uma fonte de AR1 devido à espessura das suas paredes celulares. Este tipo de amido é relativamente estável a temperaturas usuais de confeção dos alimentos ( $\approx 100^{\circ}\text{C}$ ). No entanto, processos que conduzam à rutura das paredes celulares, moagem ou mastigação, diminuem a resistência deste tipo de amido (23, 28, 30).
- O **AR2** consiste nos grânulos de amido não gelatinizados que conservaram a estrutura cristalina, pelo que não são hidrolisados pelas enzimas digestivas. São exemplos o amido da batata crua e da banana verde (23, 28, 30). O processamento e a confeção dos alimentos reduzem o teor de AR2. A banana verde, como normalmente é consumida crua, é a maior fonte de AR2 da dieta humana. Todavia, durante o processo de amadurecimento, as enzimas intrínsecas do fruto convertem o amido em açúcares, diminuindo o teor de AR2 (28).
- O **AR3** está presente na maioria dos alimentos amiláceos que sofreram um tratamento térmico (gelatinização) e de seguida foram arrefecidos e conservados desde algumas horas até vários meses. À medida que a temperatura do amido gelatinizado vai baixando, as cadeias de amido tendem a interagir mais fortemente, estabelecendo entre si pontes de hidrogénio e formando duplas hélices. Estas estruturas cristalinas são altamente estáveis e constituem o amido retrogradado. É sobretudo a amilose que está envolvida no processo de retrogradação, embora a amilopectina também possa sofrer esta transformação (22, 23, 28, 30). De uma



forma geral o amido rico em amilose é, naturalmente, mais resistente à digestão e também mais suscetível de sofrer retrogradação. Alimentos processados como batatas cozinhadas e arrefecidas, leguminosas enlatadas e flocos de milho são exemplos de alimentos com teores de AR3 elevados (31). Ciclos repetidos de aquecimento e arrefecimento parecem aumentar o teor de AR3 (28). Devido à sua estabilidade o AR3 pode ser usado como ingrediente numa grande variedade de alimentos (30).

- O **AR4** inclui amidos modificados obtidos por síntese química (ésteres e éteres) assim como amidos com ligações cruzadas. Estes amidos modificados resistem à hidrólise enzimática e a sua composição química depende do amido-base e do tipo e grau de modificações produzidas (28, 30). Até 2011 a União Europeia não aprovou a utilização deste tipo de amido devido ao elevado número de modificações químicas introduzidas, era apenas autorizado no Japão (32, 33). A Decisão 2011/494/UE de 5 de Agosto da Comissão Europeia (34) aprovou o amido de milho fosfatado como novo ingrediente alimentar para utilização, a um teor máximo de 15%, em produtos de padaria, massas alimentícias, cereais de pequeno-almoço e barras de cereais.
- Recentemente foi descrito um quinto tipo de AR, o **AR5**, patenteado por Frohberg e Quanz (35). Consiste em substâncias complexas formadas por amilose e lípidos polares (29). Este tipo de amido requer altas temperaturas para gelatinizar e é mais suscetível de sofrer retrogradação (36).

AR1, AR2 e AR3 podem coexistir no mesmo alimento (28). O processamento dos alimentos que envolve calor húmido, na maioria dos casos diminui o teor de AR1 e AR2 e favorece a formação de AR3 (32).

#### **1.4. Fontes alimentares de amido resistente**

O AR encontra-se fundamentalmente nos alimentos vegetais ricos em amido em quantidade que varia com as espécies, ocorrendo também diferenças entre variedades da mesma espécie. Encontra-se nas folhas, nos tubérculos, nos frutos e nas sementes das espécies vegetais, quer em natureza, quer processados. A forma de preparação e proces-

samento a que os alimentos são submetidos, em casa ou industrialmente, vai determinar substancialmente a proporção de amido que vai resistir à digestão (37).

A Tabela 2 apresenta o teor de amido total e de AR de alguns cereais, hortícolas e derivados que constituem importantes fontes deste componente na alimentação.

**Tabela 2** – Conteúdo de amido total e AR de algumas fontes alimentares (g/100 g de alimento)

Fonte Alimentar	Amido Total	Amido Resistente
<u>Leguminosas:</u>		
Feijão vermelho	42,6	24,6
Lentilhas	53,3	25,4
Feijão-frade	53,9	17,7
<u>Cereais:</u>		
Cevada	55,2	18,2
<b>Milho</b>	77,9	25,2
Arroz branco	95,1	14,1
Trigo	50,8	13,6
Aveia	43,4	7,2
<u>Farinhas:</u>		
<b>Milho</b>	84,3	11,0
Trigo	68,8	1,7
Arroz	86,9	1,6
Batata	81,0	1,7
<u>Derivados de cereais:</u>		
Esparguete	73,0	3,3
Flocos de aveia	56,0	8,5
Tostas	67,4	1,4
Pão Branco	46,7	1,9
Flocos de aveia extrudados	57,2	0,2
Cereais de trigo tufado	67,0	1,2
Papas de aveia	9,0	0,3
Esparguete cozido	n/a	2,9
Arroz cozido	n/a	3,7
<u>Derivados de batata:</u>		
Batatas cozidas	n/a	2,0
“Chips”	29,5	4,8
Puré de batata	n/a	2,4

Fonte: Adaptado de (37); n/a - não avaliado

Os grãos de cereais completos são ricos em AR, fibra alimentar e oligossacarídeos. O processamento de transformação dos grãos em farinha origina alterações químicas, nomeadamente a diminuição do teor de AR, provavelmente devido à diminuição do AR1.

Relativamente às leguminosas, estas apresentam uma elevada quantidade de AR que se mantém mesmo após a confeção (32).

Relativamente aos derivados da batata, é de realçar o elevado teor de AR das “chips” relativamente às batatas cozidas e ao puré de batata, que apresentam valores semelhantes entre si. Contudo, não deve ser encorajado o consumo deste tipo de alimentos dado o seu elevado teor em gordura (38).

Nos frutos, o amido funciona como reserva energética e a sua concentração diminui com o amadurecimento. A banana e a manga são exemplos de frutos que no estado imaturo (verdes) apresentam elevados teores de AR (70-80% na manga e 40-50% na banana). Durante o processo de amadurecimento do fruto o teor de AR vai gradualmente diminuindo enquanto os açúcares (glicose, frutose e sacarose) têm um comportamento em sentido inverso (37, 39).

Os diferentes tipos de cereais e as farinhas que resultam da respetiva moagem contêm teores em amilose variáveis. Sendo este o principal componente do amido que intervéem no processo de retrogradação, os produtos alimentares obtidos com diferentes cereais contêm teores em AR variáveis. A farinha de milho, muito rica em amilose, dá origem a produtos com teores elevados em AR (40-42). Pães produzidos com 70% de farinha de cevada (diferentes variedades) e 30% de farinha de trigo revelaram teores de AR significativamente superiores a pão exclusivamente de trigo (43). Um estudo com um novo genótipo de trigo, com teor mais elevado em amilose, resultou também num produto final mais rico em AR (44).

Investigações recentes demonstraram que em pão de cevada e pão de centeio foram observados teores de AR significativamente mais elevados que em pão de trigo mas com pouca aceitabilidade pelo consumidor. Em variedades menos comuns (Kamut<sup>®1</sup>, trigo espelta<sup>2</sup> e trigo sarraceno<sup>3</sup>) foi observado que pão de Kamut<sup>®</sup> e pão de espelta não apresentam diferenças significativas relativamente ao pão de trigo mas o pão de trigo sarraceno apresenta teores de AR significativamente superiores, contudo é o pão com menor aceitabilidade. A mistura de aveia, centeio, trigo sarraceno e trigo comum

---

<sup>1</sup> Marca pela qual é comercializada a variedade de trigo *Triticum turgidum spp turanicum*, também conhecido como trigo khorasan; variedade antiga que deixou progressivamente de ser utilizada

<sup>2</sup> *Triticum aestivum spp spelta*, variedade de trigo primitivo que deixou de ser utilizada

<sup>3</sup> Sementes do fruto da espécie *Fagopyrum esculentum*; apesar da sua designação não é um cereal; é isento de glúten

(20:20:20:40) mostrou ser bem aceite pelo consumidor e apresentar um teor de AR significativamente superior ao pão de trigo (45, 46). Collar *et al.* testou misturas com diferentes proporções de farinhas de trigo comum, trigo sarraceno, teff<sup>4</sup> e farinha de ervilha e em todas as fórmulas ensaiadas foram observados teores de AR significativamente superiores ao controlo (pão de trigo comum) (47). Outro estudo verificou que a substituição de 10-20% de farinha de trigo por farinha de ervilha permite obter um pão com razoável aceitabilidade e com teor de AR significativamente superior ao pão de trigo (48).

Também foi testada a utilização de farinhas provenientes de frutos, nomeadamente banana, no fabrico de pão e derivados tendo sido obtidos produtos finais com teores elevados em AR mas com menor aceitação por parte do consumidor (49-51). Rodríguez-Ambríz *et al.* determinaram a composição da farinha de banana e encontraram valores de 30,4% (peso seco) de AR (52).

Além das fontes naturais de AR, existem atualmente produtos comerciais que contêm concentrações elevadas em AR e que se destinam a enriquecer diversos produtos alimentares neste componente. Estes produtos podem ser adicionados aos alimentos tradicionais, como ingredientes, em substituição da farinha de trigo comum, com o objetivo de diminuir o valor calórico e tornar o alimento mais interessante do ponto de vista nutricional. Esta condição torna-se particularmente interessante no contexto alimentar atual, em que o consumo de fibra proveniente de frutos, hortícolas e leguminosas é baixo, a ingestão energética é frequentemente excessiva e o excesso de peso e obesidade tomam proporções preocupantes.

Existem fórmulas comerciais de AR2 derivadas de amido de milho com elevado teor em amilose e de AR3 que são obtidas a partir da gelatinização e recristalização do amido de milho ou da tapioca (31). O AR4 também já se encontra disponível como ingrediente sendo algumas fórmulas obtidas a partir da batata (53, 54). Estes ingredientes podem ser incorporados numa variada gama de produtos alimentares tais como pão, biscoitos, bolachas e massas com a vantagem de não alterarem o processo de fabrico, o aspeto, a textura ou o sabor do alimento (32). Os produtos alimentares obtidos têm melhor paladar e aceitação por parte do consumidor do que os alimentos enriquecidos com fibras tradicionais como a farinha de trigo integral (22).

---

<sup>4</sup> *Eragrostis tef*, cereal comum na Etiópia e Eritreia

### **1.5. Fatores que influenciam o teor de amido resistente nos alimentos**

Qualquer tratamento que altere a forma de organização do grânulo de amido (por exemplo a gelatinização) ou que destrua a estrutura do tecido e a integridade da célula vegetal (por exemplo a moagem) vai aumentar a acessibilidade das enzimas e reduzir, consequentemente, o teor de AR (22, 53).

A estrutura física do alimento é um dos principais fatores que determina a velocidade e extensão de digestão do amido. Durante o processamento dos cereais ocorrem alterações físicas tornando o amido mais acessível e exposto à ação das enzimas – trituração e moagem. O mesmo efeito ocorre no processo de mastigação (21). Neste caso, as variações no metabolismo individual podem influenciar a digestibilidade do amido (31). Relativamente às leguminosas verifica-se que as células que contêm os grãos de amido apresentam paredes espessas e particularmente resistentes, atuando como barreira física que dificulta o intumescimento dos grânulos e a ação das enzimas digestivas sobre o amido (21).

Outros fatores que influenciam o teor de AR num alimento estão relacionados com características intrínsecas como a relação amilose/amilopectina, a presença de açúcares, lípidos, proteínas, enzimas e outras substâncias que interferem na sua formação. Algumas destas substâncias podem estar presentes naturalmente no alimento ou podem ser adicionadas em formulações alimentares. Também os processos térmicos que, de uma forma geral, são utilizados no processamento dos alimentos e as condições de conservação a que estes são submetidos influenciam o teor em AR (22).

O amido mais rico em amilose é naturalmente mais resistente à digestão e também mais suscetível de sofrer retrogradação. A cadeia linear da amilose limita o acesso das amilases aos dois terminais de glicose, ao contrário da estrutura altamente ramificada da amilopectina que fornece múltiplos terminais de glicose de fácil acesso às enzimas (26). As longas cadeias lineares que constituem a amilose organizam-se mais facilmente em duplas cadeias para formar o amido retrogradado (AR3) do que as cadeias ramificadas da amilopectina (53). A relação amilose/amilopectina, mais elevada nas leguminosas do que na maioria das variedades de cereais e tubérculos confere a estes alimentos teores elevados de AR mesmo após o processamento (32).

Vários estudos têm sido realizados sobre a influência das diferentes formas de processamento dos alimentos no rendimento em AR. A observação dos processos de gelatinização e retrogradação do amido em amostras de trigo, milho, arroz e batata mostraram rendimentos semelhantes em AR quando as amostras foram submetidas a tratamento térmico em autoclave e em água fervente. O mesmo estudo mostrou que o pH (3,5 a 10,5) não afeta a gelatinização do amido nem a formação de AR (55). Skrabanja e Kreft verificaram que repetidos ciclos de aquecimento e arrefecimento resultam no aumento do teor de amido retrogradado (AR3) (56) especialmente se o número de ciclos de aquecimento/arrefecimento for superior a 20 (57). O armazenamento em condições de temperatura reduzida (-20°C) também parece favorecer a formação de AR (21). O rendimento em AR é ainda influenciado pelo conteúdo em água e pela temperatura / tempo de processamento (57, 58). No entanto, a amilopectina também pode sofrer retrogradação, sob determinadas condições de tempo e temperatura de armazenamento, não podendo excluir-se da fração total do amido retrogradado (21).

Foi estudada a influência dos açúcares na formação do AR e verificou-se que o rendimento em AR diminui quando é adicionada sacarose, glicose, maltose ou ribose. Os açúcares funcionam como inibidores do mecanismo de retrogradação (20).

A presença de lípidos também diminui o teor de AR. A amilose combina-se preferencialmente com os lípidos durante o aquecimento, antes do início da retrogradação (58). A comunidade científica não é unânime nesta opinião, enquanto alguns autores acreditam que o complexo amilose-lípido compete com a cristalização da amilose deixando uma menor quantidade deste polissacarídeo livre para a formação de pontes de hidrogénio originando uma diminuição do amido retrogradado, outros defendem que o próprio complexo amilose-lípido é uma forma de AR (26, 57).

A interação da proteína com o AR apresenta perspetivas diferentes relativamente aos vários tipos de amido. Alguns autores descrevem o papel da matriz proteica na qual parte do amido se encontra encapsulado (amido fisicamente inacessível). Neste caso as proteínas influenciam o AR1, contribuindo para o seu aumento. Outro aspeto diferente é o das proteínas de adição pois apesar de não ser observada uma relação linear, parece haver uma diminuição do teor de AR3 com a presença de proteína (20, 57).

Os trabalhos de Escarpa *et al.* permitem ainda identificar outras substâncias que influenciam a formação de AR: o potássio, o cálcio e as catequinas determinam uma dimi-

nuição importante no teor de AR enquanto as pectinas, gomas e ácido fítico provocam igualmente uma diminuição mas menos acentuada (20).

Apesar de alguns trabalhos de investigação em pão de trigo mostrarem que as condições de conservação não alteram significativamente o teor em AR, dado este composto se formar após a cozedura do pão e desde aí não sofrer mais alterações (59-61), Eerlingen *et al.* e Yadav encontraram diferenças significativas após conservação de pão de trigo à temperatura ambiente e a 4°C (40, 62). Particularmente em estudos realizados em pão de milho verifica-se um aumento do teor de AR com a conservação, sobretudo quando a 4°C (42). Carreira *et al.* avaliou a influência da conservação a -20°C durante 30 dias no teor de AR de esparguete, feijão, grão-de-bico e farinha de milho, concluindo que em todas as situações se verifica um aumento significativo do teor de AR (63).

#### **1.6. Benefícios fisiológicos do consumo de amido resistente**

A definição mais recente de fibra alimentar inclui o AR como um dos seus componentes (13, 14). Apesar de não fazer parte da parede celular da célula vegetal, como a maioria dos compostos que constituem a fibra, do ponto de vista nutricional tem mais semelhanças com os polissacarídeos não amiláceos do que com o amido digerível. Também o método de quantificação do AR é semelhante ao das fibras insolúveis, no entanto apresenta os benefícios fisiológicos das fibras solúveis e, tal como estas, parece ter um impacto positivo na saúde da microbiota intestinal (30).

O AR resiste à digestão no intestino delgado sendo em seguida hidrolisado, no cólon, pelas amilases bacterianas. A glicose resultante desta hidrólise é lentamente fermentada pela flora intestinal resultando dióxido de carbono, metano, hidrogénio e AGCC. Os AGCC produzidos incluem butirato, acetato e propionato, e pensa-se que são estes os responsáveis pela maioria dos efeitos benéficos do AR (31). O interesse deste componente como prebiótico tem merecido igualmente especial atenção (37) assim como a utilização do AR, em substituição do amido digerível, para reduzir o valor energético e aumentar o teor de fibra dos alimentos (31). Alguns estudos também apontam para a possibilidade de alimentos ricos em AR induzirem maior saciedade (64).

Têm sido por isso atribuídos ao AR potenciais benefícios fisiológicos, especialmente em patologias como: doenças intestinais, diabetes, doença cardiovascular, dislipidémias, obesidade e osteoporose (22, 31, 32, 36).

### **1.6.1. Doenças intestinais**

Uma das características mais interessantes do AR é o seu ritmo relativamente lento de fermentação e o perfil de AGCC produzidos. Na verdade, a produção de AGCC, em especial de butirato, durante a fermentação no cólon, é mais elevada para o AR do que para a maioria das fibras (26). O butirato é especificamente utilizado pelas células que revestem o cólon (colonócitos) como fonte de energia, enquanto os restantes AGCC são absorvidos pelo intestino e transportados para o fígado. A fermentação do AR resulta ainda numa menor produção de gases (dióxido de carbono, metano e hidrogénio) comparativamente a outros oligossacarídeos não digeríveis (31).

A fermentação do AR produz também um ambiente ácido propício à proliferação de bactérias saudáveis e inibidor de patogénicas. Ao longo do cólon, o pH vai subindo e as concentrações em AGCC vão diminuindo, correspondendo a uma absorção e utilização destes compostos pelos colonócitos. Outros efeitos, que parecem ser devidos aos AGCC, incluem a estimulação da contração muscular do cólon, aumentando a oxigenação das células e o tónus muscular (26).

Nugent concluiu existirem efeitos positivos da suplementação da dieta com AR, nomeadamente diminuição do tempo de trânsito intestinal, aumento do volume e diminuição da consistência das fezes, diminuição do pH fecal, redução dos níveis de amónia e fenol nas fezes e aumento da excreção de azoto (31).

O AR proporciona fonte de carbono e energia para 400 a 500 espécies de bactérias presentes no ambiente anaeróbio do cólon, podendo inclusivamente alterar a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal (37). Trabalhos mais recentes, estudaram a influência dos vários tipos de AR na estimulação das diferentes espécies da microbiota intestinal e no teor dos vários AGCC. As variações individuais e as diferentes fontes e tipos de AR conduziram a um número muito elevado de respostas dificultando a interpretação dos dados (29).

Relativamente ao efeito do AR na doença inflamatória intestinal, diverticulite e obstipação, há poucos estudos efetuados em seres humanos. No entanto, devido aos efeitos



benéficos no aumento do volume e consistência das fezes e na diminuição do tempo de trânsito intestinal, o incremento da ingestão de AR pode ser benéfica nestas condições clínicas (31). Moreau *et al.* verificaram melhorias clínicas em ratinhos com doença inflamatória do intestino, cuja dieta foi suplementada com AR. O mesmo não aconteceu com uma dieta suplementada com fruto-oligossacarídeos (65). Muir *et al.* num estudo com 20 voluntários demonstrou que, quando administrado em conjunto com farelo de trigo os benefícios do AR são maximizados, verificando-se uma diminuição mais acentuada do tempo de trânsito intestinal, uma diminuição significativa do pH fecal e da concentração total de fenol e amónia e um aumento significativo do volume fecal (66). Rodrigues-Cabezas refere que a administração conjunta de AR e fruto-oligossacarídeos de cadeia curta parece induzir um maior aumento de lactobacilos e bifidobactérias do que a administração isolada de cada uma destas substâncias, em ensaios com ratos (67).

Os AGCC resultantes da fermentação do AR no intestino, em especial o butirato, parecem ter uma importância acrescida. Hamer *et al.*, num ensaio clínico com 16 voluntários, concluíram que o butirato aumenta a resistência dos colonócitos aos agentes tóxicos melhorando a resposta do cólon ao stress oxidativo em indivíduos saudáveis (68).

Vários estudos epidemiológicos têm tentado relacionar os benefícios da fibra alimentar e do amido na proteção do desenvolvimento de cancro colorectal (CCR), no entanto, relativamente ao AR, a informação disponível é escassa. O estudo observacional EPIC (European Prospective Investigation in Cancer and Nutrition) levado a cabo em 10 países europeus permitiu demonstrar um efeito protetor da fibra. Em populações com baixa ingestão de fibra, a duplicação do seu consumo reduziu o risco de desenvolvimento de CCR em 40% (69). Também Cassidy *et al.* estudaram a incidência de CCR em 12 populações e concluíram existir uma forte relação inversa entre o consumo de amido e a incidência desta patologia. Sugerem ainda que este efeito é devido ao processo de fermentação do amido no cólon nomeadamente a formação relevante de butirato que inibe a proliferação de células anómalas (70).

Alguns trabalhos em humanos evidenciaram que o consumo de AR afeta favoravelmente o ambiente do lúmen do cólon e facilita a eliminação apoptótica de células geneticamente alteradas. Estes efeitos podem ser interpretados como promotores de uma melhor saúde do cólon, o que pode ser benéfico na proteção contra o risco de CCR (71-73).

Trabalhos de investigação mais recentes apresentaram resultados promissores relativamente ao possível efeito do AR na prevenção do CCR. *In vitro*, foi demonstrado que alimentos especialmente ricos em AR (feijão comum) têm um efeito inibidor no desenvolvimento de células de carcinoma de cólon humano HT-29. Pensa-se que este efeito, dependente da dose, é mediado pela concentração e perfil em AGCC produzidos (74). Também Fassler *et al.* demonstraram, em ensaios efetuados *in vitro* com células de adenocarcinoma coloretal humano Caco-2, que os produtos resultantes da fermentação do AR apresentam um efeito positivo na prevenção da carcinogénese do cólon (75). Estudos em ratinhos revelaram que a adição de AR a uma dieta com elevada ingestão de carne vermelha (associada a elevado risco de CCR) diminuiu significativamente os efeitos carcinogénicos, embora os mecanismos envolvidos não sejam completamente conhecidos (76).

Fung *et al.*, num trabalho de revisão com o objetivo de avaliar o papel do butirato na prevenção do CCR, referem a existência de evidência de que o consumo de uma dieta rica em fibra, particularmente em AR, e escassa em gorduras e proteínas é protetora para o desenvolvimento de CCR. Estes autores referem ainda que alguns indivíduos não apresentam os mesmos níveis de AGCC após o aumento do consumo de AR. Este facto parece refletir diferenças individuais do microbioma o que resulta numa diferente capacidade de fermentação do amido (77).

Parece existir um efeito positivo do AR na prevenção do CCR, no entanto, os estudos existentes em seres humanos são insuficientes não permitindo ainda estabelecer um efeito claro e evidente do efeito do AR na prevenção do CCR.

### **1.6.2. Metabolismo da glicose**

As características físico-químicas do AR e o seu comportamento como fibra alimentar sugerem que a ingestão de alimentos ricos neste componente está associada a uma diminuição da absorção dos hidratos de carbono, designadamente a diminuição da glicose pós-prandial e da resposta insulínica (64).

Apesar dos numerosos estudos efetuados sobre a influência da ingestão do AR na resposta glicémica e insulínica, os resultados são difíceis de interpretar e comparar. Esta dificuldade relaciona-se com a diversidade dos tipos de AR que são testados e também com o desenho do estudo: tipo de confeção a que o AR é submetido antes de ser testado; administrado isoladamente ou incluído numa refeição em conjunto com lípidos e proteí-

nas e presença de outras fibras alimentares. Importa realçar que nenhum dos trabalhos revelou aumento da absorção da glicose ou da resposta insulínica e que a maioria dos estudos indicia efeitos positivos após a ingestão duma refeição rica em AR. Estes efeitos consistem numa diminuição da glicémia e da insulinémia pós-prandial (31, 64).

Tendo em conta a investigação existente sobre os benefícios fisiológicos da ingestão de AR, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, ID 681) (78) aprovou recentemente o AR como ingrediente funcional. A alegação de saúde que mereceu parecer positivo dos peritos da EFSA refere que o AR reduz a resposta glicémica pós-prandial e que deverá substituir o amido digerível de modo a que o teor final de AR seja, pelo menos, 14% do amido total. Esta alegação consta do Regulamento (UE) nº 432/2012 de 16 de maio que estabelece a lista de alegações de saúde permitidas (79).

Os benefícios fisiológicos verificados quando se substitui o amido digerível por AR não comprovam as verdadeiras propriedades funcionais deste componente. Para isso é necessário investigar o efeito do AR quando o teor total dos hidratos de carbono disponíveis se mantém constante. Bodinham *et al.* testou a suplementação com AR tipo 2 face a um placebo, em igualdade de HC digeríveis, e concluiu não haver efeito significativo na resposta glicémica, apresentando contudo uma diminuição na resposta insulínica (80). Hallstrom *et al.* comparou a resposta glicémica e insulínica após ingestão de pão de trigo com teores diferentes de AR (tipo 3), mantendo constante o teor total de HC. Este estudo concluiu que há uma diminuição da glicémia pós-prandial, no entanto a resposta insulínica não apresentou diferenças significativas (44). Klosterbuer *et al.* encontraram resultados semelhantes a este último estudo, testando o AR tipo 3 num pequeno-almoço padrão (81). Haub *et al.* demonstraram que tipos diferentes de AR (AR2 e AR4) apresentam respostas glicémicas diferentes quando administrados nas mesmas doses e nas mesmas condições (82). É evidente a diversidade dos desenhos de estudo em que decorrem os vários trabalhos e a multiplicidade de respostas e ausência de consistência dos resultados obtidos. Esta realidade leva a questionar a diversidade dos efeitos fisiológicos dos diferentes tipos de AR e a necessidade de efetuar mais estudos focados em cada um dos tipos de AR (83).

A diminuição da resposta insulínica pós-prandial verificada em alguns dos ensaios, mesmo sem uma redução significativa da glicémia, pode indiciar alterações metabólicas importantes. É possível que o consumo continuado de alimentos ricos em AR possa ter

um efeito positivo na sensibilidade à insulina (64). Dos trabalhos efetuados com o objetivo de esclarecer esta relação importa referir os que avaliaram a sensibilidade à insulina pelo método considerado “*gold standard*”, o clamp euglicémico hiperinsulinémico. Robertson *et al.* compararam o efeito da ingestão de uma dieta com 30 g de AR/dia durante 4 semanas com um placebo, em indivíduos saudáveis, e concluíram que a ingestão de AR aumenta a sensibilidade à insulina (84). Johnston *et al.* monitorizaram dois grupos de indivíduos insulino-resistentes antes e depois de um período de 12 semanas, durante o qual um dos grupos ingeriu 40 g de AR/dia e o outro um placebo. Também nestes indivíduos, a ingestão crónica de AR demonstrou aumentar a sensibilidade à insulina (85). Em indivíduos obesos e com excesso de peso também se verificou um aumento significativo da sensibilidade à insulina após 4 semanas de uma dieta suplementada com 15 e 30 g/dia de AR, comparativamente a um placebo. Estas diferenças apenas se verificaram nos indivíduos do sexo masculino e não foram detetadas diferenças significativas entre a dose de 15 e 30 g/dia (86). Bodinham *et al.* averiguou a influência da ingestão de AR (40 g/dia) vs placebo na dieta de indivíduos com diagnóstico de diabetes tipo 2, devidamente controlados, durante 12 semanas. Após este tempo foi efetuado um teste de tolerância à glicose e verificaram-se valores significativamente mais baixos para o grupo suplementado com AR. A resposta insulínica não apresentou valores significativamente mais baixos e também não foram observados efeitos positivos relativamente à sensibilidade à insulina, no entanto foram também monitorizados os valores do peptídeo 1 semelhante a glucagina (GLP-1) pós-prandial que se apresentaram significativamente mais elevados no caso da dieta suplementada com AR (87). Existe alguma evidência que sugere que o consumo frequente de uma dieta rica em AR possa prevenir, retardar ou controlar a insulino-resistência, no entanto é necessário esclarecer melhor esta relação.

O AR parece revelar-se um composto importante da dieta, quer incluindo na alimentação diária alimentos naturalmente ricos neste componente, quer utilizando-o como ingrediente na confeção de alimentos. No entanto, é necessária mais informação acerca dos efeitos/doses do consumo de dietas enriquecidas com os vários tipos de AR em indivíduos saudáveis, com excesso de peso e obesidade e com diabetes tipo 2 para que sejam possíveis recomendações concretas e eficazes.

### 1.6.3. Metabolismo lipídico

Em ensaios efetuados em ratos, o AR parece influenciar significativamente o metabolismo lipídico. Foram observadas reduções importantes em diversos marcadores do metabolismo lipídico: lípidos totais, colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL) e triglicerídeos (31).

Jenkins *et al* compararam o efeito da ingestão de um suplemento de AR2, AR3 e um alimento controlo, por indivíduos saudáveis, durante 2 semanas. Verificaram não existir diferenças significativas nos níveis de colesterol pós-prandial com o alimento controlo, com o alimento com AR2 e com o alimento com AR3 (88). Também Noakes *et al*. concluíram que em indivíduos com hipertrigliceridémia, a ingestão de alimentos enriquecidos em AR durante 4 semanas, não influenciaram os valores de triglicerídeos, colesterol total, LDL ou HDL (89). Num estudo mais recente com AR4, realizado durante 12 semanas em indivíduos com síndrome metabólica, verificaram-se valores significativamente inferiores de colesterol total, HDL e LDL após ingestão de uma alimentação enriquecida com AR4 (90).

O efeito do AR no teor de lípidos circulante é um tema pouco estudado em que os reduzidos ensaios efetuados não são concordantes. Nos roedores parece claro que a ingestão de AR reduz o colesterol e os triglicerídeos circulantes mas em seres humanos não parece haver o mesmo consenso (29).

Como o risco de doença coronária está muito associado a hipercolesterolemia e hipertrigliceridémia, o consumo de alimentos ricos em AR poderá ter um papel importante na prevenção desta doença (64). No entanto, os estudos efetuados até ao momento são insuficientes sendo necessário clarificar melhor o efeito dos vários tipos de AR no metabolismo lipídico (29).

### 1.6.4. Perda e manutenção de peso

O excesso de ingestão energética é o principal responsável pelas taxas elevadas de indivíduos com excesso de peso e obesidade pelo que, as estratégias para controlar este problema, passam inevitavelmente pela restrição energética (91). Uma das formas mais eficazes de promover a perda de peso consiste em associar a diminuição da ingestão energética ao aumento do conteúdo em fibra com o objetivo de diminuir a sensação de

fome durante a restrição. Por outro lado, alguns estudos demonstraram que é mais eficaz, na perda de peso, uma dieta pobre em gordura e rica em fibra do que uma dieta apenas pobre em gordura. O aumento do teor de fibra da dieta tem também um papel importante na manutenção da perda de peso (64).

Esta convicção é apoiada por diversos estudos epidemiológicos que mostraram claramente que a fibra é uma ferramenta importante na prevenção e controlo da obesidade. A ingestão de fibra está inversamente associada ao ganho de peso e gordura corporal, verificando-se que o aumento do teor de fibra na alimentação induz um aumento da saciedade, uma diminuição da ingestão alimentar e consequentemente uma redução do peso corporal (92). Kendall *et al.* afirmam ainda que uma dieta rica em fibra associada a alimentos de baixo Índice Glicémico (IG) é muito importante na prevenção e controlo de diversas doenças crónicas (93).

Relativamente ao AR, como componente da fibra alimentar, há várias razões para acreditar que pode ajudar na perda e manutenção de peso. A primeira razão tem a ver com o valor energético do AR que é claramente inferior ao do amido digerível (8kJ/g vs 15kJ/g). Substituindo o amido digerível por AR resulta num alimento com menor densidade energética e com um poder saciante mais elevado (91).

Contudo, diversos estudos em roedores e em seres humanos demonstraram que a suplementação da dieta com AR comparativamente a uma dieta sem este componente, não promove a diminuição significativa do peso corporal. Os estudos em roedores evidenciam um aumento da oxidação das gorduras e uma diminuição da oxidação dos HC e das proteínas. Desta forma, o AR contribui para a diminuição da massa gorda sem alterações significativas na massa magra. Estes estudos mostraram ainda que é a gordura visceral que está maioritariamente envolvida neste processo, o que é vantajoso pois é este o tipo de gordura que está sobretudo associado à dislipidémia, obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (94).

Adicionalmente, a manutenção da massa magra é um fator importante na manutenção da perda de peso. Higgins *et al.* mostraram o efeito positivo da complementaridade de uma dieta rica em AR e da prática de exercício físico na manutenção do peso após um processo de perda de peso corporal (95).

A substituição do amido digerível por AR significa uma diminuição da disponibilidade dos HC originando uma redução da secreção de insulina e um aumento da oxidação

das gorduras de forma a proporcionar a energia necessária (96). Higgins sugere que ocorre simultaneamente um efeito inibidor da glicólise no fígado promovido pelos AGCC resultantes da fermentação do AR, acentuando a diminuição da disponibilidade de acetil coenzima A proveniente dos HC. As células vão mobilizar a produção deste composto a partir das gorduras ( $\beta$  oxidação) promovendo a sua oxidação de forma a obter a energia necessária (64).

O Quociente Respiratório (QR) é um indicador do tipo de substrato energético que está a ser predominantemente oxidado; valores elevados indicam essencialmente uma oxidação dos HC, enquanto valores mais baixos indicam que são as gorduras que estão a contribuir para a obtenção de energia. Estudos em seres humanos demonstraram uma diminuição do QR após a ingestão de uma refeição suplementada com AR evidenciando um aumento da oxidação das gorduras comparativamente a uma refeição sem AR. Esta investigação desenvolvida por Higgins *et al.* demonstrou um aumento significativo da oxidação das gorduras (QR mais baixo) após a ingestão de uma refeição em que 5,4% do total de HC foram substituídos por AR, comparativamente a uma refeição não suplementada. No entanto, importa realçar que o mesmo estudo verificou que a substituição de 10,7% dos HC por AR não demonstrou diferenças significativas relativamente à refeição não suplementada o que leva a sugerir que há uma dose em que o efeito é máximo e que a adição de AR acima deste valor não confere benefícios metabólicos. Os autores explicam este facto sugerindo que a concentração de 10,7% excede a capacidade fermentativa do cólon sendo a maior parte deste AR eliminado na forma insolúvel. Nesta situação o AR desempenha essencialmente a função de fibra insolúvel, diminuindo o tempo de trânsito intestinal e levando à eliminação dos lípidos da dieta que não ficam disponíveis para oxidação e até mesmo do próprio AR. A taxa de produção de AGCC fica diminuída não sendo evidentes os efeitos verificados com a dose de 5,4%. O efeito positivo observado com a substituição de 5,4% do total de HC poderá ser importante e conduzir a uma diminuição da deposição de gordura a longo prazo (97).

Importa referir o trabalho de Johnston *et al.* que testou a ingestão de um suplemento de 40 g de AR/dia face a um placebo, em indivíduos com síndrome metabólica, durante 12 semanas. Embora tenha concluído existir um efeito benéfico do AR na sensibilidade à insulina, não detetou alterações significativas na adiposidade corporal ou no perfil lipídico, ao contrário do que acontece em ensaios com roedores. Estes autores sugere-

rem existir diferenças inter-espécies e que, as alterações metabólicas evidenciadas nos roedores, necessitam de um período mais prolongado na espécie humana (1 ano ou mais) para se exprimirem (85).

O aumento da saciedade resultante do incremento do teor de fibra da alimentação é explicado por vários mecanismos, nomeadamente pelo atraso do esvaziamento gástrico e da absorção dos macronutrientes e pela metabolização tardia dos AGCC (resultantes da fermentação no cólon) que poderá fornecer uma quantidade de energia adicional com repercussões na diminuição da sensação de apetite. É ainda sugerido que a fibra aumenta os níveis de hormonas gastrointestinais, nomeadamente colecistoquinina (CCK), peptídeo 1 semelhante a glucaginea (GLP-1) e peptídeo tirosina-tirosina (PYY) que atuam, a nível central, como indutores da saciedade (92, 98, 99).

Relativamente ao AR foram realizados vários estudos mas a metodologia utilizada e o desenho dos ensaios dificultou a comparação dos resultados. Os métodos de avaliação da saciedade, já por si uma medida muito subjetiva, não foram iguais em todos os estudos além da diferente composição da refeição em que foi incluído o AR (o teor de gordura é um fator muito importante na avaliação da saciedade assim como a presença de outras fontes de fibra), a duração do estudo e o tipo de AR testado (64, 100).

Bodinhham *et al.* verificaram que o consumo de 48 g de AR2 dividido pelas refeições do pequeno-almoço e almoço não influenciaram a sensação de apetite avaliada numa escala visual analógica, segundo Flint *et al.* (101), mas reduziram a ingestão energética na refeição do jantar (80).

Os trabalhos de Willis *et al.* sugerem o contrário, a ingestão de um “muffin” suplementado com 8 g de AR3 reporta níveis de saciedade significativamente superiores em comparação com o mesmo alimento sem AR (102).

Klosterbuer *et al.* não encontrou diferenças significativas nos níveis de saciedade após a ingestão de um pequeno-almoço suplementado com 25 g de AR3 nem na quantidade de ingestão energética *ad libitum* das refeições do almoço e resto do dia.. Este ensaio comparou a suplementação com AR com a suplementação com igual quantidade de outra fibra solúvel e com uma refeição idêntica pobre em fibra. Neste estudo foram monitorizados os níveis de GLP-1 que se revelaram inferiores mas não estatisticamente diferentes no caso da refeição suplementada com AR comparativamente às restantes situações (81).



#### **1.6.5. Absorção de sais minerais**

Alguns autores descrevem o papel do AR no aumento da absorção de sais minerais como o cálcio, magnésio, zinco, ferro e cobre em ratos. Em seres humanos, este efeito parece limitar-se ao cálcio, não tendo sido detetadas diferenças na absorção dos outros sais minerais (32). Foi sugerido que a acidificação provocada pela fermentação do AR possa aumentar a solubilidade do cálcio no cólon, e desta forma, aumentar a sua absorção (26).

#### **1.7. O amido resistente como componente da dieta**

A definição e a metodologia de quantificação da fibra alimentar têm sido alvo de diversas modificações nos últimos dez anos. Os métodos usualmente empregues para do-seamento deste grupo nutricional não incluem a totalidade da fração de AR assim como de alguns oligossacáridos não digeríveis. Por outro lado, existem métodos específicos para quantificar os diferentes componentes da fibra alimentar, entre eles o AR, mas o somatório destes valores não corresponde ao teor total de fibra (103).

Como não há uma relação direta entre o teor de AR e o teor total de fibra, para os alimentos naturalmente ricos em AR e em especial para os alimentos suplementados com este ingrediente, os valores indicados nas tabelas de composição de alimentos para a fibra alimentar estão sub-quantificados, por não incluírem a fração de AR entre outros componentes. Nestes casos, o IG parece ser um conceito nutricional mais válido.

O IG é um indicador relevante da qualidade dos HC permitindo uma nova visão entre a relação dos efeitos fisiológicos dos alimentos ricos em HC e a saúde. Existe evidência científica relativamente ao benefício da utilização de alimentos contendo HC com baixo IG na prevenção e/ou controlo da obesidade e outras doenças associadas (104).

O conceito de IG é definido como o incremento da área sob a curva de resposta glicémica (*Incremental Area Under the Curve – AUC*) em resposta a uma porção de um dado alimento com 50 g de HC disponíveis. É expresso em percentagem relativamente à AUC em resposta a 50 g de glicose no mesmo indivíduo (105).

O IG é uma propriedade do alimento cuja determinação obedece a uma metodologia bem definida e precisa (106, 107). A FAO e a OMS reconheceram oficialmente que o conceito de IG poderia constituir uma ajuda na luta contra a obesidade. O comité referido

apoiou a utilização do IG como método de classificação de alimentos ricos em HC e recomendou que os valores de IG nos alimentos deveriam ser utilizados em conjunto com a restante informação nutricional na rotulagem do alimento (108).

O conceito relacionado de carga glicémica (CG) baseia-se na premissa de que a resposta glicémica não depende apenas do IG do alimento mas também da quantidade de HC ingeridos ou seja, a CG varia com a porção consumida (109).

Não é fácil estimar a ingestão de AR pelas populações uma vez que este composto não faz parte das tabelas de composição de alimentos. Alguns estudos tentaram quantificar a ingestão de AR que varia consideravelmente de país para país. Estima-se que nos países em desenvolvimento com consumo muito elevado de amido, a ingestão de AR se situe entre 30 e 40 g/dia/indivíduo (31). A ingestão média diária de AR em países como a Índia e China é de 10-18 g (110, 111). Já na Europa, o consumo médio situa-se entre 3-6 g/dia e na Austrália entre 5-7 g/dia (31). Em particular na Itália, são verificados consumos médios mais elevados (8,5 g/dia) que parece dever-se ao elevado consumo de pão, massas e legumes neste país (112). No Reino Unido foi estimado um consumo de AR de 2,76 g/dia (113) e Elmstahl determinou um consumo médio de 3,2 g por dia na Suécia (38). As recomendações sobre o consumo de AR apontam para 20 g/dia de forma a obter os benefícios anteriormente descritos (22, 32).

O AR parece ser aceite mais facilmente do que outras formas de fibras alimentares (farelo de trigo, por exemplo) em níveis elevados na dieta humana. Só para doses superiores a 30 g/dia de AR são descritos problemas de meteorismo, ligeiros efeitos laxantes e dores de estômago (31).

### **1.8. Aplicações do amido resistente**

O AR é atualmente um composto de elevado interesse quer para a indústria alimentar quer para os nutricionistas. Os motivos que justificam este interesse estão relacionados com os potenciais benefícios fisiológicos e com as suas propriedades físico-químicas que permitem a obtenção de produtos de elevada qualidade nutricional, com o mínimo de adaptações tecnológicas e não alcançáveis com as tradicionais fibras insolúveis (32).

Há uma grande variedade de produtos alimentares que pode ser enriquecida com AR como por exemplo pão, “*corn flakes*”, bolos, biscoitos, massas alimentícias, alimentos

panados, queijo, gelados, iogurte e sobremesas lácteas. O tipo de AR a utilizar deverá ter em conta as características do alimento assim como o processamento a que o alimento ainda vai ser sujeito antes de ser consumido. O AR1 e o AR2 podem ser anulados por tratamentos térmicos mas o AR3 resiste a temperaturas elevadas ou pode mesmo formar-se quando o alimento é submetido a altas temperaturas e é, de seguida, arrefecido (36).

O pão é um dos alimentos cujo desenvolvimento de variantes enriquecidas em fibra é muito comum. Este tipo de alimentos possui geralmente cor escura, textura arenosa, maior densidade, sabor característico e reduzido volume de expansão relativamente aos alimentos refinados, o que desagrada à maioria dos consumidores (26). Por outro lado o pão é um dos alimentos base da dieta dos portugueses fornecendo grande quantidade de HC, sobretudo na forma de amido.

A utilização de AR como ingrediente alimentar, em substituição da farinha, permite conferir as vantagens fisiológicas da fibra, sem alterar o sabor, a textura e as propriedades sensoriais. É branco, possui um sabor suave e reduzido tamanho de partícula além da baixa capacidade de retenção de água comparativamente com as outras fibras convencionais. Estas características possibilitam o mínimo de ajustes na formulação, processamento e armazenamento dos alimentos e a obtenção de produtos finais com textura, sabor e características muito semelhantes aos alimentos refinados, com a vantagem de apresentarem um valor energético mais baixo e demais benefícios fisiológicos já descritos anteriormente (22, 26).

Outra forma de incrementar o teor de AR no pão sem recorrer à adição deste composto como ingrediente e que tem sido o objetivo de vários trabalhos de investigação, consiste em modificar as condições e a fórmula de fabrico. A cozedura prolongada a baixa temperatura confere ao produto final uma concentração mais elevada em AR do que o pão cozido nas condições usuais (180 a 200°C durante cerca de 30 min) (42-44, 62, 114, 115). Também a presença de ácido láctico parece aumentar a sua concentração (44, 114, 115) assim como um maior teor de água na massa (59, 60). A substituição de parte da farinha de trigo por novos genótipos de trigo mais ricos em amilose também resultou num pão com maior teor de AR (44). Estudos já anteriormente mencionados em que foi substituída parte da farinha de trigo por farinha de milho, cevada, aveia ou centeio (40, 43, 46, 115), por farinha de banana verde (49, 50), por farinha de ervilha (47, 48), e por farinha de trigo-sarraceno ou teff (45-47) revelaram que estas farinhas são potenciais

ingredientes para a indústria de panificação dando origem a pães com elevado teor em AR, embora com menor aceitabilidade por parte dos consumidores.

O aumento do teor de AR no pão, quer por adição do AR como ingrediente, quer por modificação do processo de fabrico, resulta na obtenção de um pão com propriedades funcionais e efeitos benéficos para o consumidor.

Outro exemplo de alimento que pode beneficiar do enriquecimento com AR são as massas alimentícias. Existem massas alimentícias integrais no mercado que são mal aceites pelo consumidor devido à sua textura, características organoléticas, cor e elevado tempo de cozedura. Gelencsér *et al.* testou a substituição da farinha de trigo por AR a dois níveis, 10 e 20%, na elaboração de massas. Neste estudo verificou que as características de cozedura e as propriedades sensoriais das massas não apresentaram diferenças significativas relativamente à massa não suplementada (116). Também Aravind *et al.* comparou massas com substituição da farinha de trigo comum por 10, 20 e 50% de AR2 e de AR3 com massas sem substituição. Os resultados deste estudo sugerem que a substituição de 10 e 20% quer de AR2, quer de AR3, não produzem diferenças significativas na textura, características sensoriais e nas perdas de massa pela cozedura comparativamente à massa de controlo. Apenas a coloração amarela ficou diminuída nas massas enriquecidas. Estes resultados foram opostos aos verificados numa massa em que 20% da farinha foi substituída por farinha integral (117).

A microencapsulação é igualmente uma importante aplicação do AR. Neste processo pretende-se “empacotar” entidades ou estruturas sensíveis como antioxidantes, minerais, vitaminas ou microorganismos, para que resistam aos processos de conservação e/ou alarguem o prazo de validade dos alimentos ou ainda que, simplesmente, resistam ao processo digestivo e só sejam libertados no trato intestinal (36, 37, 118). Esta última aplicação é especialmente importante para aumentar a viabilidade dos probióticos e prolongar, desta forma, o prazo de validade dos produtos lácteos fermentados (119). Ziar *et al.* demonstraram que a microencapsulação de probióticos em grânulos de alginato de cálcio e AR apresentam uma taxa de sobrevivência superior aos probióticos sem encapsulação, em iogurte, num modelo que simula as condições gastrointestinais (120).

Numa perspetiva mais tecnológica, o AR pode também ser utilizado para aumentar a textura crocante dos alimentos, sobretudo quando durante o processamento é aplicado

calor na superfície do alimento. Esta característica é normalmente um fator do agrado do consumidor (22).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi determinar o efeito da ingestão de pão com elevado teor em AR, obtido por otimização do processo de fabrico, na resposta glicémica, insulínica e na saciedade de indivíduos não diabéticos.

O pão é um dos alimentos base e uma das mais importantes fontes de HC da dieta dos portugueses. Segundo dados recolhidos no âmbito do projeto EpiPorto, 96% da população refere ingerir pão diariamente (121). Também os resultados do Inquérito Nacional de Saúde 2005/2006 revelam a presença do pão em 92% das refeições principais e em 50% das pequenas refeições (122). De uma forma geral, o pão de trigo comum contém pequenas quantidades de AR, cerca de 1,2 g/100 g de pão (123).

De forma a alcançar este objetivo geral foi delineada uma abordagem em 4 fases consecutivas, cujos objetivos específicos são descritos de seguida:

### 1ª Fase

Determinar o efeito de alguns fatores na formação de AR no pão de trigo, nomeadamente:

- 1) Fórmula - razão farinha/água, adição de farinha de espelta, adição de ácido láctico, adição de “massa azeda”.
- 2) Tamanho do pão – 35, 70, 140 e 400 g.
- 3) Condições de cozedura – 200°C/30 min, 150°C/3 horas e 120°C/4 horas.
- 4) Condições de conservação – temperatura ambiente ( $\approx 22^{\circ}\text{C}$ ), 4°C e -20°C durante 1, 3, 5 e 7 dias.

### 2ª Fase

Desenvolver a formulação de um pão com teor elevado em AR com base nos resultados do ensaio anterior.

### 3ª Fase

Determinar, *in vivo*, o efeito da ingestão de pão com elevado teor em AR na resposta glicémica e insulínica de indivíduos não diabéticos.

Determinar o efeito da ingestão de pão com elevado teor em AR na saciedade de indivíduos não diabéticos.

#### **4ª Fase**

Determinar o Índice Glicémico (IG) do pão com elevado teor em AR e do pão controlo dos ensaios anteriores.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Efeito da fórmula, do tamanho do pão, da cozedura e das condições de conservação na formação de amido resistente no pão de trigo

##### 3.1.1. Materiais e equipamentos

Na preparação das amostras foram utilizados produtos comuns adquiridos no comércio designadamente farinha de trigo tipo 65 (marca própria Continente), farinha de espelta (Próvida, Portugal), fermento de padeiro prensado (Mauri, Itália) e sal de mesa comum. Os equipamentos usados foram: amassadeira para pão (marca Santos), estufa de fermentação (marca REKENA Elektro-Proof) e forno de cozedura (marca Elektro Grant). Em todos os ensaios foram utilizados reagentes químicos de qualidade analítica de *Riedel-de-Haen*, *Panreac* ou *Fisher Chemicals*. O doseamento do AR foi realizado com o *Resistant Starch Assay Kit (K-RSTAR)* da *Megazyme International Ireland Ltd.* adquirido a Enzymatic (Portugal).

##### 3.1.2. Preparação de amostras

Foram preparadas a fórmula base e seis variantes cujas formulações se encontram descritas na Tabela 3.

**Tabela 3** – Fórmula base (REF) e variantes testadas, relativamente à razão farinha:água (AGI e AGS), substituição parcial de farinha de trigo por farinha de espelta (E25 e E50), adição de ácido láctico (AL) e adição de massa azeda (MA)

	REF	AGI	AGS	E25	E50	AL	MA
Farinha de trigo tipo 65 (g)	1000	1000	1000	750	500	1000	1000
Farinha de espelta (g)	0	0	0	250	500	0	0
Água (ml)	625	500	714	625	625	625	625
Ácido láctico (90 wt%) (ml)	0	0	0	0	0	16	0
Massa azeda (g)	0	0	0	0	0	0	100
Sal (g)	15	15	15	15	15	15	15
Fermento de padeiro (g)	20	20	20	20	20	20	10

REF – fórmula base; AGI – 2,0 farinha:1 água; AGS – 1,4 farinha:1 água; E25 – 25% de farinha de espelta; E50 – 50% de farinha de espelta; AL – adição de ácido láctico; MA – adição de massa azeda



Na preparação dos pães tradicionais é muitas vezes utilizado como agente de fermentação a “massa azeda”, “massa velha” ou “massa mãe”, que consiste numa porção de massa de pão do fabrico do dia anterior que sofreu uma fermentação prolongada de cerca de 24 horas à temperatura ambiente. Esta massa contém leveduras características da fermentação do pão (*Sacharomyces cerevisiae*) e várias espécies de bactérias lácticas, presentes naturalmente na farinha, que se desenvolvem no processo de fermentação prolongado. Este agente de fermentação complexo é uma fonte de ácido láctico (124).

A espelta (*Triticum aestivum* spp *spelta*) é um trigo primitivo que deixou de ser utilizado devido ao baixo rendimento de produção. Recentemente encontrou um novo mercado na área dos alimentos saudáveis e com benefícios para a saúde. A farinha de espelta contém elevada quantidade de AR, aproximadamente oito a dez vezes mais que o trigo comum (3,7% vs 0,4%) (45).

Todas as formulações foram elaboradas de acordo com a tecnologia tradicional de fabrico de pão. Procedeu-se à mistura de todos os ingredientes, na amassadeira, numa primeira fase durante 5 min a velocidade baixa e, posteriormente, durante mais 10 min a velocidade elevada. Na fórmula AL o ácido láctico foi dissolvido na água. A massa foi colocada na estufa de fermentação a 30°C e com humidade relativa de 85%, durante 40 min para a primeira fermentação. De seguida a massa foi dividida em porções de 84 g (70 g após cozedura), moldada em pequenos pães e colocada novamente a fermentar nas mesmas condições durante mais 40 min. Os pães foram cozidos a 200°C durante 30 min. Após a cozedura foram arrefecidos durante 2 h à temperatura ambiente ( $\approx 22^{\circ}\text{C}$ ) e, seguidamente, foram analisados relativamente ao teor de humidade e teor de AR no mesmo dia em que foram produzidos.

A partir da fórmula base foram ensaiados diferentes tamanhos de pão e condições de cozedura. Foram preparadas cinco variantes da fórmula base (REF), cujas formulações se encontram descritas na Tabela 4. Para os pães de 35 g, 140 g e 400 g a massa de pão após a primeira fermentação foi dividida em porções de 45 g, 162 g e 440 g, respetivamente.

A fim de avaliar a influência das condições de conservação na formação de AR, foram preparadas amostras de pão segundo a fórmula base (REF) que, após arrefecimento, foram acondicionadas em embalagens de plástico e colocadas nas condições descritas na Tabela 5.

**Tabela 4** – Fórmula base (REF) e diferentes condições testadas relativamente a tamanho do pão (P35, P140 e P400) e condições de cozedura (T150 e T120)

	REF	P35	P140	P400	T150	T120
Peso do pão (g)	70	35	140	400	70	70
Condições de cozedura	200°C / 30 min.				150°C/ 3 h	120°C/ 4 h

**Tabela 5** – Condições de conservação (temperatura / tempo) testadas a partir da fórmula base

Temperatura ambiente (≈22°C)	4°C	-20°C
1 dia	1 dia	1 dia
3 dias	3 dias	3 dias
5 dias	5 dias	5 dias
7 dias	7 dias	7 dias

A preparação da fórmula base e de cada uma das vinte e três variantes foram repetidas quatro vezes. Em cada uma das repetições foi analisada uma amostra composta por quatro unidades de pão, exceto para o P35 que foram oito, o P140 que foram duas e o P400 que foi apenas uma. Cada uma destas amostras foi ainda analisada em duplicado.

### 3.1.3. Determinações analíticas

#### Preparação da amostra

A preparação da amostra foi efetuada a partir de 4 unidades de pão (≈ 70 g cada) de cada variante ensaiada. Cada pão foi cortado em cruz e utilizou-se os dois quadrantes opostos que foram triturados e homogeneizados. Retirou-se uma porção de 50 g que foi novamente triturada de forma a passar por um crivo de 1,0 mm de dimensão da malha. Esta fração foi usada para a determinação do AR. O restante pão triturado e homogeneizado foi usado para a determinação da humidade.

No caso dos ensaios em que foi testado o tamanho do pão, a amostra foi constituída por oito pães de 35 g, dois pães de 140 g e um pão de 400 g, seguindo a mesma metodologia de preparação da amostra.

### **Humidade**

O teor de humidade do pão foi determinado de acordo com o método oficial AACC 44-15.02 (125) e norma portuguesa NP 2966:1986. Este método determina o teor de humidade através da perda de peso de uma amostra submetida a determinadas condições de temperatura. Numa primeira fase a amostra de pão fragmentada (aproximadamente 100 g) foi submetida a uma temperatura de 65°C durante 16 h. Na segunda fase do processo, foi retirada uma fração de 5 a 7 g, triturada e colocada numa estufa de ar quente com ventilação até peso constante.

### **Amido resistente**

O AR foi quantificado segundo o método oficial AACC 32-40.01 (126) e AOAC 2002.02 (127). O método foi realizado utilizando o *Resistant Starch Assay Kit (K-RSTAR)* da *Megazyme International Ireland Ltd.*

A partir da amostra inicial de aproximadamente 50 g devidamente triturada e homogeneizada foi pesada, em duplicado, uma toma de amostra de  $100 \pm 5$  mg. Foi adicionada solução tampão de maleato de sódio (pH 6,0) contendo as enzimas  $\alpha$ -amilase pancreática e amiloglucosidade e após homogeneização procedeu-se à incubação das amostras num banho de água com agitação horizontal (100 rpm) a 37°C durante 16 h. Esta fase pretende simular o processo digestivo. Todo o amido não resistente foi dissolvido e hidrolisado a glicose por ação combinada das duas enzimas, ficando dissolvida na fração líquida.

A reação foi interrompida pela adição de etanol (99% v/v) e as duas fases foram separadas por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min, obtendo-se o AR no resíduo sólido (pellet) e o amido não resistente na fração líquida. O resíduo sólido foi lavado, duas vezes com solução de etanol (50% v/v) seguido de centrifugação. A fração aquosa foi rejeitada e o resíduo sólido (contendo o AR) foi dissolvido em solução de hidróxido de potássio 2M com agitação contínua em banho de água e gelo durante 20 min. Após este tempo a solução foi neutralizada com solução tampão de acetato de sódio (pH 3,8) e o amido foi hidrolisado a glicose pela ação da enzima amiloglucosidade em banho de água a 50°C durante 30 min. Todo o AR da amostra foi, nesta fase transformado em glicose.

As amostras foram novamente centrifugadas e foi retirada uma alíquota de 0,1 ml da fração líquida, em duplicado. Em simultâneo foram preparados dois ensaios brancos com 0,1 ml de solução tampão de acetato de sódio 0,1M (pH=4,5) e quatro padrões de

glicose com 0,1 ml de solução de glicose (1 mg/ml). Para o doseamento da glicose por método espectrofotométrico foram adicionados 3 ml de reagente de glicose oxidase / peroxidase (GOPOD) a todos os tubos, seguido de incubação a 50°C durante 20 min e leitura da absorvância de cada solução a 510 nm contra o ensaio branco.

A média dos valores do teor de glicose das duas repetições de cada amostra corresponde à concentração de AR da amostra ensaiada quando comparada com os valores dos padrões de glicose.

Todo o trabalho experimental descrito foi realizado pela autora do estudo.

### **3.2. Desenvolvimento de um pão com elevado teor em amido resistente**

#### **3.2.1. Materiais e equipamentos**

Os materiais utilizados foram semelhantes aos do ensaio anterior, com acréscimo de farinha de milho (Espiga, Portugal). A introdução deste ingrediente, muito rico em amilose (Tabela 2), teve como objetivo promover a formação de AR, uma vez que, como já foi referido, é sobretudo a amilose que sofre o processo de retrogradação. Por outro lado, tradicionalmente em Portugal, a farinha de milho é um ingrediente comum no fabrico de algumas variedades de pão denominadas genericamente de broas.

Os equipamentos utilizados foram os mesmos referidos no ponto 3.1.

#### **3.2.2. Preparação de amostras**

Foram preparadas amostras de pão conjugando no mesmo produto as variáveis estudadas anteriormente que mostraram ter um efeito significativamente positivo na formação do AR. A partir desta formulação foi ainda preparada uma amostra em que 20% da farinha de trigo foi substituída por farinha de milho (Tabela 6).

Após a primeira fermentação a massa foi dividida em porções de cerca de 440 g, acondicionada em formas individuais e colocada a fermentar durante mais 40 min. De forma a prolongar o tempo de cozedura do pão, a forma com a massa foi envolvida em duas folhas de papel de alumínio e foi submetida a cozedura à temperatura que evidenciou promover maior formação de AR (120°C). De forma a determinar o tempo de cozedura, foi avaliada a perda de peso de 30 em 30 min até peso final aproximado de 400 g.

**Tabela 6** – Fórmulas de pão com elevado teor em AR

	PAR(T)	PAR(M)
Farinha de trigo tipo 65 (g)	1000	800
Farinha de milho (g)	0	200
Água (ml)	714	714
Sal (g)	15	15
Fermento de padeiro (g)	20	20

PAR(T) – 100% farinha de trigo; PAR(M) – 80% farinha de trigo e 20% farinha de milho

### 3.2.3. Determinações analíticas

A preparação da amostra, a determinação do teor de humidade e de AR foram realizadas de acordo com a metodologia anteriormente descrita (ponto 3.1.3.). A formulação encontrada que correspondeu ao pão com teor mais elevado em AR e a fórmula de referência (REF) foram caracterizadas relativamente aos principais macronutrientes: proteína, lípidos, hidratos de carbono e fibra.

#### Proteína

O teor de proteína bruta do pão foi determinado de acordo com a norma portuguesa NP 2030:1996 que se baseia no método de *Kjeldahl*. Para o cálculo considerou-se o fator 6,25 de acordo com a recomendação da FAO (128).

#### Lípidos

O teor de lípidos total foi realizado com base na norma portuguesa NP 1974:2009 que se baseia no método de *Soxhlet*.

#### Hidratos de carbono disponíveis

A determinação do teor de HC totais disponíveis foi realizada com base na metodologia recomendada pela FAO (128).

#### Fibra

A determinação da fibra foi realizada de acordo com a Norma Portuguesa NP 2029:1982

Todo o trabalho experimental descrito foi realizado pela autora do estudo com exceção das determinações analíticas: proteína, lípidos, hidratos de carbono disponíveis e fibra, descritas no ponto 3.2.3.

### **3.3. Efeito da ingestão de pão com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica e insulínica e na saciedade de indivíduos não diabéticos**

Foi realizado um ensaio *in vivo* com indivíduos não diabéticos. O estudo consistiu num ensaio cruzado em ocultação simples e com ingestão única. As amostras testadas foram o pão com elevado teor em AR (PAR) desenvolvido anteriormente e um pão controlo (REF) produzido de acordo com a fórmula base anteriormente definida (baixo teor de AR).

#### **3.3.1. População do estudo**

Os indivíduos foram recrutados entre voluntários oriundos do Instituto Politécnico de Beja. Os critérios de inclusão foram: idade compreendida entre 18 e 65 anos, IMC igual ou superior a 18,5 kg/m<sup>2</sup>, peso estável pelo menos nos últimos 3 meses e sem diagnóstico de diabetes *mellitus*. Foram considerados critérios de exclusão: história clínica de doença gastrointestinal ou distúrbios endócrinos, uso de medicamentos que interfiram com o metabolismo glicídico e/ou lipídico, internamento hospitalar nos últimos 3 meses, gravidez ou aleitamento, fumadores, indivíduos que normalmente não ingerem a refeição do pequeno-almoço e vegetarianos.

O convite para participação no estudo foi enviado por *e-mail* a toda a comunidade do Instituto Politécnico de Beja: funcionários docentes, funcionários não docentes e alunos (Apêndice 1).

#### **Entrevista inicial**

Os indivíduos que se apresentaram como voluntários realizaram uma entrevista individual para confirmação dos critérios de inclusão e exclusão para participação no estudo e recolha de dados. Para todos os indivíduos que cumpriram os critérios de participação foi preenchida uma ficha com os seguintes dados: contactos pessoais (*e-mail*, número de telemóvel), data de nascimento, disponibilidade para participação nas sessões, peso e altura (Apêndice 2).

Para avaliação do peso foi utilizada uma balança marca Tanita SC 330 (capacidade de 270,0 kg e precisão de 0,1 kg). Os indivíduos foram pesados descalços e com roupas leves. A altura foi avaliada com um estadiómetro marca Tanita (extensão máxima de

2,100 m e precisão de 0,001 m) considerando-se o ponto correspondente ao topo da cabeça. Os indivíduos estavam descalços, com os pés juntos e voltados para a frente, em posição ereta, ombros relaxados e braços ao longo do corpo, com a cabeça orientada de acordo com o plano de Frankfurt.

Para cada participante do estudo foi calculado e avaliado o IMC de acordo com as recomendações da OMS (129). Com base no IMC, foram organizados dois grupos:

- grupo **N** (normoponderais) - 16 indivíduos com IMC inferior a 25,0 kg/m<sup>2</sup>;
- grupo **E** – 16 indivíduos com IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m<sup>2</sup> (excesso de peso) e 5 com IMC superior ou igual a 30,0 kg/m<sup>2</sup> (obesidade).

Para despiste de diagnóstico de diabetes *mellitus*, todos os participantes realizaram o doseamento da hemoglobina HbA1c. Este procedimento foi realizado no Serviço de Diabetes do Hospital José Joaquim Fernandes integrado na Unidade Local de Saúde do Baixo Alentejo, EP que disponibilizou gratuitamente este teste de diagnóstico para todos os voluntários do estudo.

Todos os indivíduos que participaram no ensaio foram informados oralmente e por escrito (Apêndice 3) de todos os procedimentos e assinaram um documento de consentimento informado (Apêndice 4).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar Lisboa Norte / Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 22 de maio de 2014.

### **Orientações e procedimentos pré-intervenção**

Os voluntários do estudo foram orientados para que no dia antes de cada ensaio evitassem exercício físico intenso, ingestão de álcool e ingestão de alimentos especialmente ricos em fibra na refeição do jantar (cereais integrais e hortícolas em abundância). Foi também recomendado que na véspera dos dias dos ensaios a refeição do jantar fosse o mais semelhante possível ao habitual, realizada por volta das 20,00 h e que não ingerissem alimentos ou bebidas desde o jantar até ao momento do ensaio. Os indivíduos do grupo **N** efetuaram quatro ensaios (amostra de pão PAR, amostra de pão REF, duas vezes o alimento de referência – glicose) e os indivíduos do grupo **E** realizaram dois ensaios, um com o pão PAR e outro com o pão REF. Para cada indivíduo os ensaios foram intervalados em pelo menos uma semana.

### 3.3.2. Desenho do estudo

Os voluntários chegaram ao local do ensaio, em jejum, entre as 8,00 h e as 9,30 h, onde permaneceram até ao final do ensaio (cerca de 120 min após a chegada). Em jejum foram efetuados três procedimentos:

- duas leituras da glicémia capilar, utilizando o glicosímetro *OneTouch Verio* da marca *LifeScan (Johnson & Johnson)* de acordo com as instruções do fabricante;
- recolha de sangue capilar (100 µl) para tubo *Multivette®* (Sarstedt) destinado a posterior doseamento da insulina;
- preenchimento da Escala Visual Analógica (VAS) para avaliação da percepção de saciedade (Apêndice 5).

De seguida, durante 12 a 15 min, os voluntários consumiram a amostra em teste - PAR (102 g) ou REF (88 g) - com 250 ml de água. Cada porção de pão continha exatamente 50 g de HC disponíveis. Em cada ensaio foi testada uma das amostras, definida aleatoriamente.

Foi considerado o tempo 0, o momento em que o indivíduo iniciou a ingestão do pão em ensaio. A partir deste momento foram cronometrados os seguintes tempos: 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Em cada um dos tempos foi efetuada uma leitura da glicémia capilar, como descrito anteriormente e o preenchimento da VAS. Aos 30 min foi ainda efetuada uma nova recolha de sangue capilar para doseamento da insulina. A tabela 7 apresenta o esquema de recolha de dados.

No final de cada ensaio foi oferecido um lanche aos participantes.

**Tabela 7** – Esquema de recolha de dados no ensaio *in vivo*

Tempo	Glicémia	Insulina	VAS
0	2 ✓	✓	✓
15	✓		✓
30	✓	✓	✓
45	✓		✓
60	✓		✓
90	✓		✓
120	✓		✓



### **Determinação da resposta glicêmica**

Os valores da glicemia foram expressos em mmol/l de sangue. Para cada indivíduo foi calculada a área incremental abaixo da curva da glicemia (AUC). O cálculo foi efetuado geometricamente por aplicação do método trapezoidal e ignorando as áreas abaixo da linha do jejum (106).

### **Doseamento da insulina**

As amostras recolhidas, após coagulação, foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min. Foi retirado o soro sobrenadante e congelado a -20°C até ao momento do ensaio.

O doseamento da insulina foi efetuado no soro por método imunoenzimático – técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Foi utilizado o *Insulin ELISA kit* (ME E-0900) da *Labor Diagnostika Nord* (Alemanha).

Para cada ensaio foi calculada a diferença do valor de insulina aos 30 min e em jejum de cada voluntário.

### **Escala visual analógica para avaliação da percepção de saciedade**

A escala visual analógica publicada e validada por Flint *et al.* (101) foi traduzida o mais fielmente possível. Para avaliação da sensação de apetite foram estimados os seguintes parâmetros:

- Quão satisfeito se sente? (nada satisfeito/totalmente satisfeito);
- Quanta fome sente agora? (não tenho fome nenhuma/ nunca tive tanta fome);
- Quão cheio se sente? (completamente vazio/não consigo comer mais nada) e
- Quanto acha que conseguiria ainda comer? (absolutamente mais nada/muito).

A escala consiste em segmentos de reta de 100 mm de comprimento com as expressões acima indicadas entre parêntesis ancoradas a cada uma das extremidades, exprimindo a sensação mais positiva e a mais negativa da escala. A escala foi preenchida colocando um ponto sobre a reta que exprime a sensação de proximidade/afastamento relativamente às expressões dos extremos. Não foi permitido aos voluntários comparar cada uma das avaliações com as anteriores ou conversar sobre o preenchimento da mesma.

As respostas da VAS foram convertidas em valores correspondentes à medida, em milímetros, do extremo esquerdo da linha de 100 mm ancorada a cada parâmetro até ao

ponto colocado pelo voluntário sobre a reta. Para a avaliação da percepção de saciedade foram elaboradas quatro curvas para cada indivíduo que exprimem a percepção relativamente a “Quão satisfeito se sente?”, “Quanta fome sente agora?”, “Quão cheio se sente?” e “Quanto acha que conseguiria ainda comer?” desde a situação de jejum até aos 120 min após a ingestão do pão. Para cada parâmetro e para cada participante do estudo, foi calculada a área entre a curva e a linha de base (linha em jejum) ignorando os valores negativos.

Todo o trabalho experimental descrito foi realizado pela autora do estudo com exceção do doseamento da insulina nas amostras já preparadas.

### 3.4. Determinação do Índice Glicémico do pão com elevado teor em amido resistente e do pão de controlo

O IG reflete o potencial de aumento da glicémia de um alimento em comparação com o padrão (glicose) e é uma propriedade do alimento, não devendo ser confundido com resposta glicémica. A fórmula seguinte exprime de forma mais precisa este conceito (104).

$$IG = \frac{\sum_{x=1}^n 100 \times Fx \div \overline{Gx}}{n}$$

Onde,  $Fx$  é o incremento da AUC no sujeito  $x$  provocado por uma dose de alimento testado que contenha 50 g de HC disponíveis e  $\overline{Gx}$  corresponde à AUC média no sujeito  $x$  provocado por 50 g de glicose testada em duas sessões distintas. O  $IG$  corresponde à média destes valores em  $n$  sujeitos, que deve ser de pelo menos 10 participantes.

Foi calculado o IG de cada um dos pães de acordo com a metodologia indicada pela FAO/OMS (108), Brouns *et al.* (106) e Wolever *et al.* (107). De acordo com a metodologia descrita, apenas foram considerados os indivíduos normoponderais.

Os ensaios complementares para determinação do IG cumpriram um desenho de estudo idêntico ao descrito no ponto 3.3.2., sendo a amostra constituída por 50 g de glicose anidra (alimento de referência) dissolvida em 250 ml de água. As determinações efetuadas foram a glicémia capilar aos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Foi determinada a AUC da glicémia seguindo a mesma metodologia anteriormente descrita.

Todo o trabalho experimental descrito foi realizado pela autora do estudo.

### 3.5. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos dados foi efetuado utilizando o programa *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)*, versão 23.0.

Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (DP).

Para analisar os efeitos da fórmula, do tamanho do pão e das condições de cozedura, os dados foram estudados utilizando a análise de variância ANOVA a um fator (*ANOVA one-way*) e a comparação entre pares de médias foi efetuada pelo teste de *Duncan*. Para as condições de conservação, os dados foram tratados com recurso a análise de variância ANOVA a dois fatores (*ANOVA two-way*) seguida do teste de *Duncan*.

Para analisar os dados da glicémia, insulinémia e percepção da saciedade foram usados os testes *t-Student* para amostras independentes (distribuição normal dos dados) ou teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney* (quando o pressuposto da normalidade não foi verificado) para comparar o grupo N (normoponderais) e o grupo E (excesso de peso/obesidade). Quando não foram verificadas diferenças entre os dois grupos, os dados foram tratados em conjunto. A significância da diferença entre a glicémia, insulinémia e percepção de saciedade após a ingestão de pão PAR e pão REF foi avaliada com o teste *t-Student* para amostras emparelhadas (distribuição normal dos dados) ou teste não paramétrico de *Wilcoxon* (quando os dados não apresentaram distribuição normal).

No caso da percepção de saciedade ainda foi testada, para cada parâmetro, a diferença entre os diferentes momentos de recolha de dados (15, 30, 45, 60, 90 e 120 min) e a linha de base (0) recorrendo ao teste não paramétrico de *Wilcoxon*.

Os pressupostos para aplicação destes tratamentos, nomeadamente a normalidade das distribuições e a homogeneidade de variâncias foram avaliados, respetivamente com o teste de *Shapiro-Wilk* e com o teste de *Levene* (130). Consideraram-se estatisticamente significativos os efeitos cujo *p-value* foi inferior ou igual a 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito da fórmula, do tamanho do pão, da cozedura e das condições de conservação na formação de amido resistente no pão de trigo

#### 4.1.1. Influência da formulação

Foram produzidas seis variantes da fórmula de referência alterando a razão farinha:água, adição de ácido láctico ou massa azeda e substituição parcial da farinha de trigo comum por farinha de espelta (naturalmente mais rica em AR). As condições de cozedura foram idênticas em todas as variantes (200°C durante 30 min). Após tratamento estatístico dos dados relativos ao teor de AR é possível afirmar que a alteração da formulação teve um efeito estatisticamente significativo no teor de AR ( $F(6,21)=6,955$ ,  $P=0,000$ ). A Tabela 8 representa os resultados do teor de humidade e a comparação de médias do teor de AR das amostras estudadas.

**Tabela 8** – Teor de humidade e de AR das diferentes fórmulas de pão testadas

PRODUTOS	HUMIDADE (%)	AR (g/100 g peso seco)
REF	35,4 ± 0,65	1,18 ± 0,02 <sup>ab</sup>
AGI	33,0 ± 2,43	1,08 ± 0,04 <sup>a</sup>
AGS	36,5 ± 2,68	1,39 ± 0,07 <sup>c</sup>
E25	35,8 ± 0,53	1,24 ± 0,04 <sup>b</sup>
E50	35,3 ± 0,93	1,24 ± 0,17 <sup>b</sup>
AL	31,1 ± 0,29	1,23 ± 0,05 <sup>b</sup>
MA	35,1 ± 2,52	1,05 ± 0,10 <sup>a</sup>

REF – receita base; AGI – 2,0 farinha:1 água; AGS – 1,4 farinha:1 água; S25 – 25% farinha de espelta; S50 – 50% farinha de espelta; AL – adição de ácido láctico; MA – adição de massa azeda

Todos os valores representam a média ± DP, n=4

Valores em coluna que não mostram as mesmas letras são significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ )

O teor de AR na fórmula AGS (razão 1,4 farinha:1 água, o que corresponde a maior quantidade de água na massa) é significativamente superior ao da fórmula base e das restantes formulações ensaiadas. Nesta fórmula o teor de AR sofreu um aumento de 18% relativamente ao pão REF; as restantes fórmulas revelaram variações não significativas,

um aumento modesto de 5% (S25, S50 e AL) ou até mesmo uma diminuição de cerca de 8 a 10% (AGS e MA).

#### 4.1.2. Influência do tamanho do pão e das condições de cozedura

Foram testados três tamanhos de pão (P35, P140 e P400) e duas condições de tempo/temperatura de cozedura (T150 e T120) relativamente ao pão REF. A análise de variância dos dados indica que há um efeito significativo destes fatores no teor de AR ( $F(5,18)=8,326$ ,  $P=0,000$ ), em particular das condições de tempo/temperatura de cozedura. Os resultados do teor de humidade e de AR das diferentes variantes ensaiadas estão representados na Tabela 9 assim como os resultados da comparação entre médias do teor de AR.

**Tabela 9** – Teor de humidade e de AR nos diferentes tamanhos de pão e condições de cozedura

PRODUTOS	HUMIDADE (%)	AR (g/100 g peso seco)
REF	35,4 ± 0,65	1,18 ± 0,02 <sup>a</sup>
P35	32,6 ± 0,60	1,21 ± 0,04 <sup>a</sup>
P140	37,6 ± 0,58	1,28 ± 0,05 <sup>ab</sup>
P400	40,1 ± 0,06	1,34 ± 0,04 <sup>b</sup>
T150	18,3 ± 0,66	1,36 ± 0,09 <sup>bc</sup>
T120	22,2 ± 1,71	1,46 ± 0,12 <sup>c</sup>

REF – receita base; P35 – 35g; P140 – 140g; P400 – 400g; T150 – cozedura a 150°C/3h; T120 – cozedura a 120°C/4h

Todos os valores representam a média ± DP, n=4

Valores em coluna que não mostram as mesmas letras são significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ )

Este é o primeiro estudo, que tenhamos conhecimento, em que foi analisado o efeito do tamanho do pão na formação de AR e, na realidade, revelou que um aumento do tamanho do pão conduziu a um maior teor de AR. Um pão com 400 g apresentou uma concentração de AR significativamente maior (14%) que o pão REF (70 g). Também o pão de 140 g apresentou um aumento de 8,5% de AR, embora esta diferença não seja significativa.

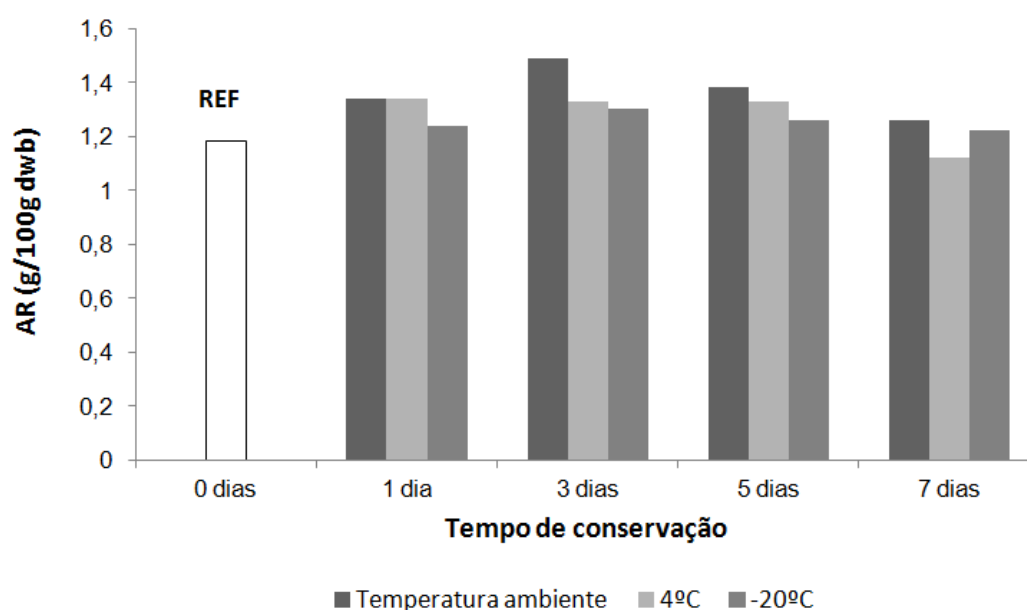
A cozedura a 120°C/4 h e a 150°C/3 h conduziu a pães com uma concentração de AR significativamente mais elevada que o pão REF (200°C/30 min.). Por sua vez T120 mos-

trou conter mais AR que T150. Relativamente a REF, T150 e T120 apresentaram aumentos de 15% e 24%, respetivamente.

#### 4.1.3. Influência das condições de conservação

Foram investigadas três temperaturas de conservação (temperatura ambiente, refrigeração e congelação) durante 1 a 7 dias. Após tratamento estatístico dos dados relativos ao teor de AR é possível afirmar que o tempo de conservação teve um efeito estatisticamente significativo ( $F(3,39)=6,939$ ,  $P=0,001$ ) assim como a temperatura de conservação ( $F(2,39)=6,126$ ,  $P=0,005$ ). Contudo o efeito da temperatura sobre o teor de AR não foi influenciado pelo tempo (ou vice-versa) como sugere a interação não significativa entre os dois fatores ( $F(6,39)=1,167$ ,  $P=0,343$ ).

A Figura 1 representa o teor de AR nas diferentes condições de tempo/temperatura de conservação testadas.



**Figura 1** – Efeito do tempo (entre 0 e 7 dias) e da temperatura de conservação (temperatura ambiente, 4°C e -20°C) no teor de AR

A comparação entre médias do teor de AR dos diferentes tratamentos está representada na Tabela 10.

**Tabela 10** – Teor de AR (g/100 peso seco) após diferentes condições de conservação

	Sem conservação	Temperatura ambiente	4°C	-20°C
0 dias	1,18 ± 0,02 <sup>ab</sup>	---	---	---
1 dia	---	1,34 ± 0,13 <sup>bcd</sup>	1,34 ± 0,05 <sup>bcd</sup>	1,24 ± 0,06 <sup>abc</sup>
3 dias	---	1,49 ± 0,06 <sup>d</sup>	1,33 ± 0,18 <sup>bc</sup>	1,30 ± 0,16 <sup>bc</sup>
5 dias	---	1,38 ± 0,07 <sup>cd</sup>	1,33 ± 0,05 <sup>bc</sup>	1,26 ± 0,06 <sup>abc</sup>
7 dias	---	1,26 ± 0,15 <sup>abc</sup>	1,12 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,05 <sup>ab</sup>

Todos os valores representam a média ± DP, n=4

Valores que não mostram as mesmas letras são significativamente diferentes (P≤0,05)

De uma forma geral, a conservação a qualquer das temperaturas testadas contribuiu para o aumento do teor do AR no pão. Este aumento verificou-se até aos 3 dias, a partir dos quais diminuiu até níveis próximos do pão REF, aos 7 dias de conservação. Particularmente, os valores registados em pães conservados à temperatura ambiente durante 3 e 5 dias foram significativamente mais elevados do que no pão do próprio dia. O maior aumento do teor de AR (26% relativamente ao pão REF) foi observado em pão conservado à temperatura ambiente durante 3 dias. A esta temperatura de conservação verificou-se um aumento de 14% após 1 dia e de 17% após 5 dias. A conservação a temperaturas de congelação (-20°C) foi a condição que revelou um menor contributo para a formação de AR. Sob condições de refrigeração (4°C) também se observou um aumento da formação de AR mas em menor extensão do que à temperatura ambiente.

#### 4.2. Desenvolvimento de um pão com elevado teor em amido resistente

Foram preparadas amostras de pão com cerca de 400 g de peso final de acordo com a fórmula da variante AGS (1,4 farinha:1 água) submetidas a cozedura a 120°C. Foi ainda preparada uma amostra com substituição de 20% de farinha de trigo por farinha de milho. O processo de cozedura do pão decorreu a 120°C durante 7 h. A Tabela 11 representa os resultados do teor de humidade e de AR das amostras preparadas.

O pão preparado exclusivamente com farinha de trigo revelou um aumento do teor de AR em 219% (3,77 vs 1,18 do pão REF). A substituição parcial de farinha de trigo por

farinha de milho conduziu a um aumento ainda maior do teor de AR, 267% superior ao pão REF e 15% superior ao pão PAR(T).

**Tabela 11** – Teor de humidade e de AR nas amostras de pão com elevado teor de AR

PRODUTOS	HUMIDADE (%)	AR (g/100 g peso seco)
PAR(T)	43,6 ± 0,90	3,77 ± 0,14
PAR(M)	43,7 ± 0,55	4,33 ± 0,12

PAR(T) – 100% farinha de trigo; PAR(M) – 80% farinha de trigo e 20% farinha de milho  
Todos os valores representam a média ± DP, n=3

O pão PAR(M) apresentou-se como a formulação que melhor correspondeu ao objetivo deste ensaio. Por facilidade de designação será adiante identificado por pão PAR.

A caracterização do pão PAR e do pão REF encontra-se representada na Tabela 12.

**Tabela 12** – Teor em proteína, gordura, HC e AR do pão PAR e do pão REF (g/100 g de pão), n=2

Nutrientes (g/100 g de pão)	REF	PAR
Proteína	7,5	5,5
Lípidos	0,04	0,03
Hidratos de carbono	57,1	48,8
AR	0,8	2,4
Humidade	34,2	43,1
Fibra	0.36	0.17

A dose equivalente a 50 g de hidratos de carbono para cada um destes pães é de 88 g para a amostra REF e de 102 g para o pão PAR e contém, respetivamente, 0,7 g de AR e 2,5 g de AR por dose.

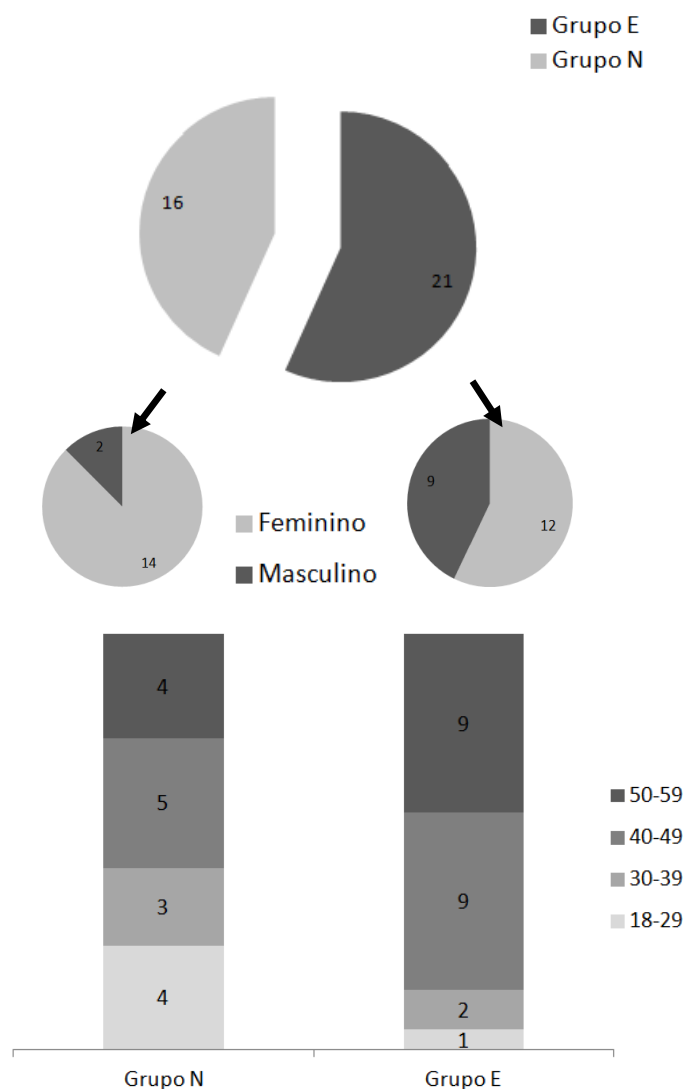
#### 4.3. Efeito da ingestão de pão com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica e insulínica e na saciedade de indivíduos não diabéticos

##### 4.3.1. Caracterização da população do estudo

Os indivíduos que participaram no estudo foram divididos em dois grupos de acordo com o respetivo IMC. A Figura 2 representa a distribuição dos voluntários por IMC, género



e faixa etária. No grupo E estão incluídos 16 indivíduos com IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m<sup>2</sup> (excesso de peso) e 5 com IMC ≥ 30,0 kg/m<sup>2</sup> (obesidade).



**Figura 2** – Caracterização dos voluntários por IMC (N < 25,0; E ≥ 25,0), género e faixa etária

A população do estudo é maioritariamente do género feminino, com idades compreendidas entre os 22 e os 59 anos. Os 5 indivíduos com obesidade têm idades compreendidas entre os 45 e os 53, sendo um do género masculino e os restantes do género feminino.

#### 4.3.2. Resposta glicémica

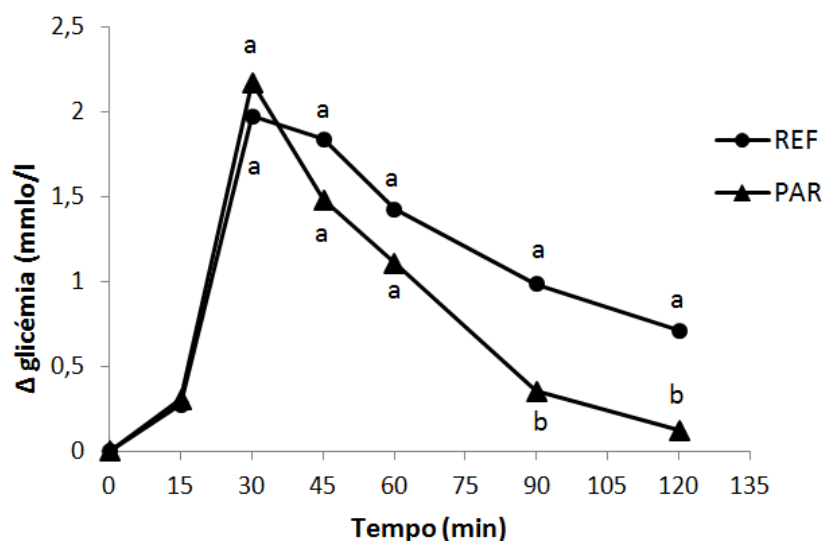
A avaliação da glicémia capilar foi efetuada em jejum (0) e 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min após a ingestão dos dois pães do ensaio (REF e PAR) pelos indivíduos dos 2 grupos do estudo. Os resultados estão expressos na Tabela 13.

**Tabela 13** – Valores médios da glicemia (mmol/l) em jejum e após ingestão das amostras (REF e PAR) por grupo de indivíduos do estudo (N – normoponderais; E - excesso de peso/obesidade)

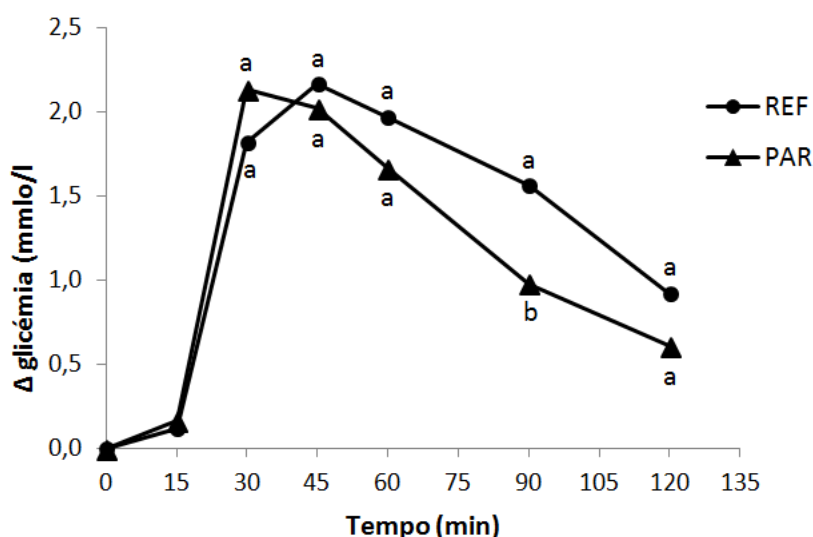
Tempo	REF		PAR	
	Grupo N	Grupo E	Grupo N	Grupo E
0	5,33±0,35	5,44±0,38	5,45±0,35	5,35±0,39
15	5,61±0,91	5,56±0,51	5,75±0,63	5,52±0,63
30	7,30±1,03	7,24±1,28	7,62±0,93	7,48±1,07
45	7,17±0,91	7,61±1,19	6,94±0,95	7,37±1,26
60	6,76±1,02	7,43±1,33	6,56±0,93	7,02±0,98
90	6,29±0,70	7,01±1,78	5,80±0,55	6,33±0,89
120	6,04±0,83	6,36±0,87	5,57±0,63	5,96±0,90

REF – pão de referência; PAR – pão com elevado teor em AR  
Todos os valores representam a média ± DP

A variação da glicose capilar pós-prandial no sangue dos indivíduos do grupo N está representada na Figura 3 e dos indivíduos do grupo E, na Figura 4.



**Figura 3** – Incremento da glicemia pós-prandial após a ingestão do pão REF e do pão PAR nos indivíduos normoponderais (grupo N), n=16; para cada tempo, pontos do gráfico que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes, ( $P \leq 0,05$ )



**Figura 4** – Incremento da glicemia pós-prandial após a ingestão do pão REF e do pão PAR nos indivíduos com excesso de peso/obesidade (grupo E), n=21; para cada tempo, pontos do gráfico que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes, ( $P \leq 0,05$ )

No grupo N verificou-se que para as duas amostras o valor máximo alcançado ocorreu aos 30 min e foi ligeiramente superior no caso do pão PAR (2,2 vs 2,0). No grupo E, o valor máximo (2,2) observou-se 45 min após a ingestão do pão REF e para o pão PAR o pico da curva da glicemia verificou-se aos 30 min e foi ligeiramente inferior (2,1). Em ambos os grupos, na fase descendente da curva da glicemia, observou-se um decréscimo mais rápido e acentuado após a ingestão do pão PAR. A comparação das médias nos diferentes momentos de leitura revelou que: no grupo N foram observadas diferenças significativas aos 90 min ( $P=0,019$ ) e 120 min ( $P=0,007$ ); no grupo E só foram observadas diferenças significativas aos 90 min ( $P=0,009$ ).

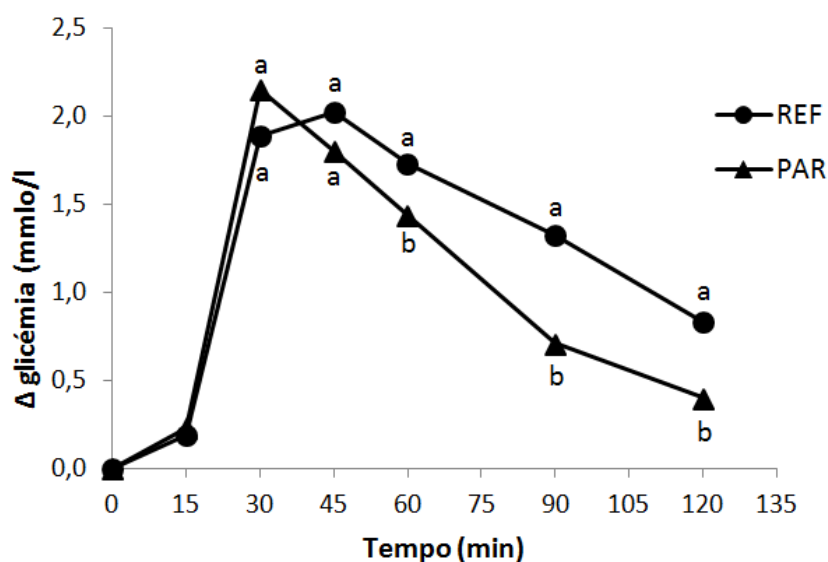
A diferença entre os valores da glicemia dos indivíduos do grupo N vs grupo E não foi estatisticamente significativa. Face a estes resultados os dados da glicemia foram analisados sem separação por grupos.

Para o conjunto dos indivíduos do estudo, a Tabela 14 apresenta os valores médios da glicemia e a Figura 5 representa a variação da glicose capilar ao longo do tempo, até aos 120 min.

**Tabela 14** – Valores médios da glicémia (mmol/l) em jejum e após ingestão das amostras (REF e PAR) para o conjunto dos indivíduos do estudo

Tempo	REF	PAR
0	5,39 ± 0,36	5,39 ± 0,37
15	5,58 ± 0,70	5,62 ± 0,63
30	7,27 ± 1,16	7,54 ± 1,00
45	7,41 ± 1,08	7,19 ± 1,15
60	7,13 ± 1,23	6,83 ± 0,98
90	6,71 ± 1,06	6,10 ± 0,80
120	6,22 ± 0,86	5,79 ± 0,81

REF – pão de referência; PAR – pão com elevado teor em AR  
Todos os valores representam a média ± DP, n=37



**Figura 5** – Incremento da glicémia pós-prandial após a ingestão do pão REF e do pão PAR para o conjunto dos indivíduos do estudo, n=37; para cada tempo, pontos do gráfico que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes

Para o total dos participantes observou-se que o valor máximo alcançado é ligeiramente superior no caso do pão PAR (2,1) e ocorreu aos 30 min, a partir deste momento diminuiu de forma rápida e acentuada. No caso do pão REF o valor máximo foi atingido aos 45 min (2,0) ocorrendo depois uma diminuição menos acentuada.

A comparação das médias entre as duas amostras em cada um dos tempos de avaliação da glicémia capilar pelo teste *t-Student* para amostras emparelhadas permitiu observar diferenças significativas nos momentos 60 min ( $P=0,041$ ), 90 min ( $P=0,001$ ) e 120 min ( $P=0,006$ ). Nos momentos 30 e 45 as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.

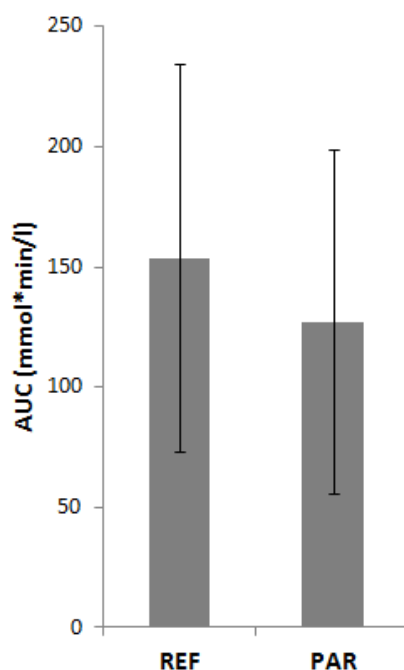
Foi calculada a AUC para cada indivíduo. Os valores médios observados nas amostras testadas, por grupo e para o conjunto dos indivíduos, estão representados na Tabela 15.

**Tabela 15** – Valores médios da AUC da glicémia (mmol\*min/l) após ingestão das amostras (REF e PAR) por grupo (N – normoponderais; E - excesso de peso/obesidade) e para o conjunto dos indivíduos do estudo

Indivíduos	REF	PAR
Grupo N (n=16)	137,86 ± 62,46	106,57 ± 68,58
Grupo E (n=21)	165,90 ± 91,36	142,83 ± 71,33
Todos os indivíduos (n=37)	153,77 ± 80,38	127,15 ± 71,54

Para cada uma das amostras, as diferenças observadas entre os dois grupos pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney* não foram estatisticamente significativas ( $P=0,387$  para o pão REF e  $P=0,083$  para o pão PAR), pelo que os dados foram tratados sem separação por grupo. A dimensão da amostra constituída pelo total dos participantes (n=37) permitiu assumir, segundo Marôco, que a distribuição da média amostral é satisfatoriamente aproximada à normal (130). Avocando esta condição, foi efetuado o tratamento dos dados que revelou existir uma diminuição estatisticamente significativa da AUC após a ingestão do pão PAR relativamente ao pão REF;  $t(36)=2,234$ ;  $P=0,016$ . A Figura 6 ilustra os resultados obtidos.

Em suma, as diferenças observadas na resposta glicémica de indivíduos não diabéticos normoponderais e com excesso de peso/obesidade não foram estatisticamente significativas para cada uma das amostras ensaiadas. Após a ingestão do pão PAR e até aos 120 min observa-se uma resposta glicémica menor e estatisticamente significativa do que após a ingestão do pão REF pelos mesmos indivíduos.



**Figura 6** – AUC média após ingestão das duas amostras (REF e PAR) para o conjunto dos indivíduos, n=37

#### 4.3.3. Resposta insulínica

A avaliação da insulina capilar foi efetuada em jejum (0) e 30 min após a ingestão dos dois pães do ensaio (REF e PAR) pelos indivíduos dos 2 grupos do estudo. Os resultados estão expressos na Tabela 16.

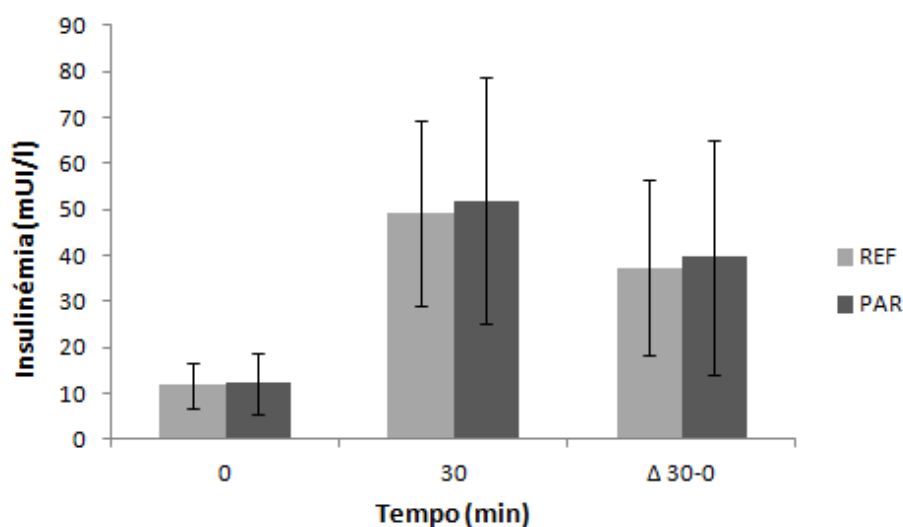
**Tabela 16** – Valores médios da insulina (mUI/l)<sup>5</sup> em jejum, 30 min após ingestão das amostras (REF e PAR) e incremento (30-0) por grupo de indivíduos do estudo (N – normoponderais; E - excesso de peso/obesidade)

Tempo	REF		PAR	
	Grupo N	Grupo E	Grupo N	Grupo E
<b>0</b>	11,64±5,41	13,20±6,19	11,80±6,53	15,37±6,19
<b>30</b>	52,85±20,03	47,24±30,48	50,07±28,58	65,41±28,37
<b>Δ insulina</b>	41,21±17,65	35,78±24,77	38,27±27,84	49,74±24,08

REF – pão de referência; PAR – pão com elevado teor em AR  
Todos os valores representam a média ± DP

<sup>5</sup> 1 UI = 41 µg

A comparação dos valores médios do incremento de insulina entre o grupo N e o grupo E revelou que não existem diferenças significativas para as amostras em estudo ( $P=0,500$  para o pão REF e  $P=0,230$  para o pão PAR). Face a estes resultados os dados da insulinémia foram analisados sem separação por grupos. Para o conjunto dos indivíduos, os valores da insulinémia em jejum, aos 30 min e o incremento do valor da insulina no sangue após ingestão dos dois pães estudados, foi representado na Figura 7.



**Figura 7** – Insulinémia média em jejum, pós-prandial aos 30 min e incremento entre as duas avaliações após ingestão das duas amostras (REF e PAR),  $n=25$

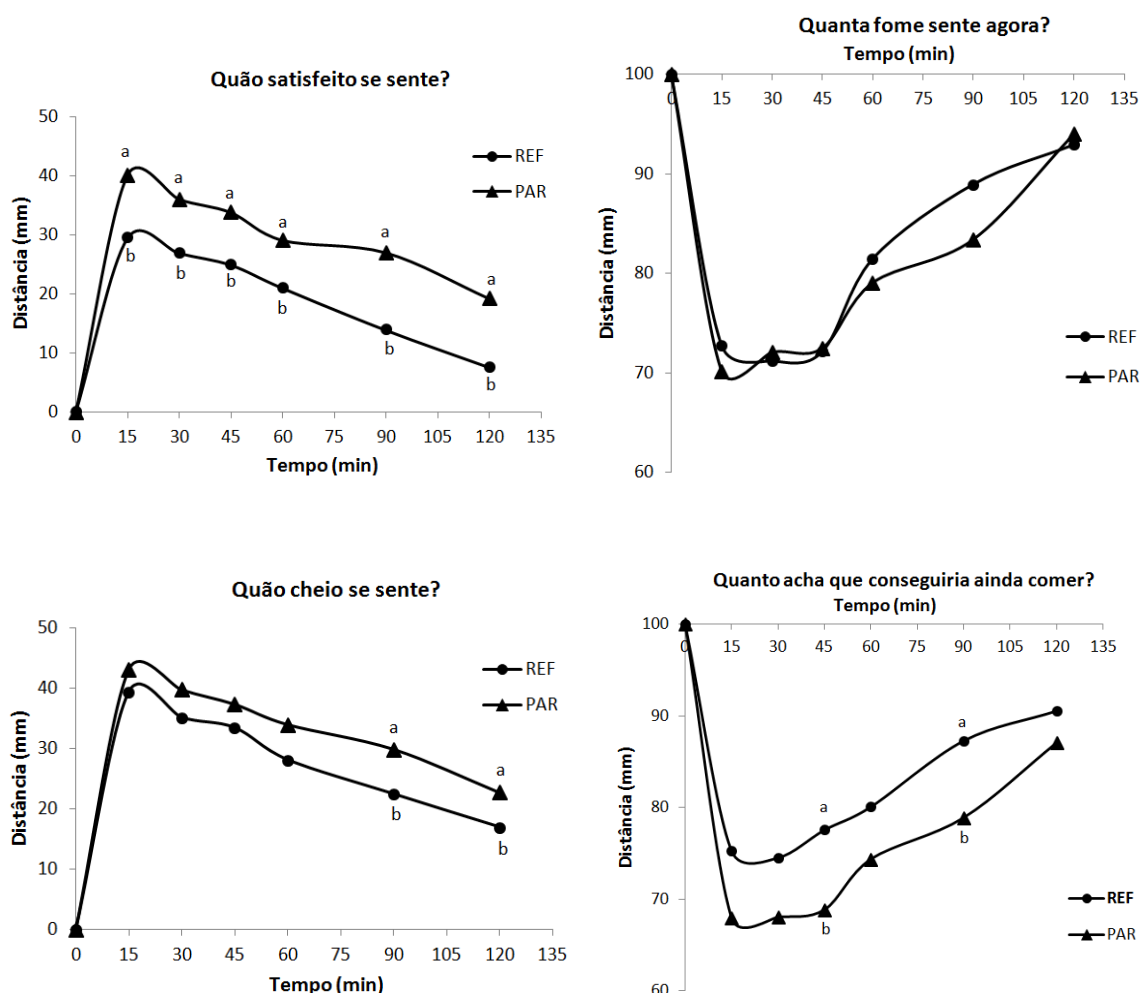
Após ingestão do pão PAR observou-se um incremento do valor da insulina no sangue ligeiramente superior relativamente ao pão REF (39,69 vs 37,37). Contudo, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas,  $t(24)=-0,374$ ,  $P=0,356$ .

A resposta insulínica entre os dois grupos de participantes do estudo é semelhante assim como após a ingestão do pão REF ou do pão PAR, até aos 30 min.

#### 4.3.4. Perceção da saciedade

Os dados obtidos da aplicação da VAS em jejum e aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min após a ingestão do pão REF e do pão PAR pelos dois grupos de participantes no estudo, foram expressos em milímetros (mm), numa escala que vai desde zero (0) a cem (100). Foram comparados os valores médios correspondentes entre o grupo N e o grupo E e as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.

Para o conjunto dos indivíduos, a Figura 8 representa o traçado médio que exprime a percepção da saciedade, para cada um dos parâmetros de avaliação. Foi efetuado o ajuste à respetiva linha de base.



**Figura 8** – Percepção da saciedade relativamente aos 4 parâmetros avaliados para as duas amostras (REF e PAR), n=37; para cada tempo, pontos do gráfico que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes

De um modo geral, o traçado relativo ao pão PAR foi indicador de maior saciedade relativamente ao pão REF. Apenas para o parâmetro “Quanta fome sente agora?” os valores observados foram muito semelhantes. A comparação das médias entre as duas amostras em cada um dos tempos de avaliação permite afirmar que relativamente à questão “Quão satisfeito se sente?” os valores foram significativamente mais elevados para o pão PAR em todos os momentos: 15 ( $P=0,008$ ), 30 ( $P=0,008$ ), 45 ( $P=0,014$ ), 60 ( $P=0,018$ ), 90 ( $P=0,005$ ) e 120 ( $P=0,017$ ). Para o parâmetro “Quão cheio se sente?” o pão PAR revelou



valores significativamente mais elevados aos 90 min ( $P=0,038$ ) e 120 min ( $P=0,05$ ) e à questão “Quanto acha que conseguiria ainda comer?” foram observados valores estatisticamente significativos aos 45 min ( $P=0,031$ ) e aos 90 min ( $P=0,05$ ).

Os resultados foram convertidos em área entre a curva e a linha de base (linha em jejum) para cada uma das questões da VAS e para cada um dos voluntários. A média dos valores obtidos está representada na Tabela 17 e na Figura 9.

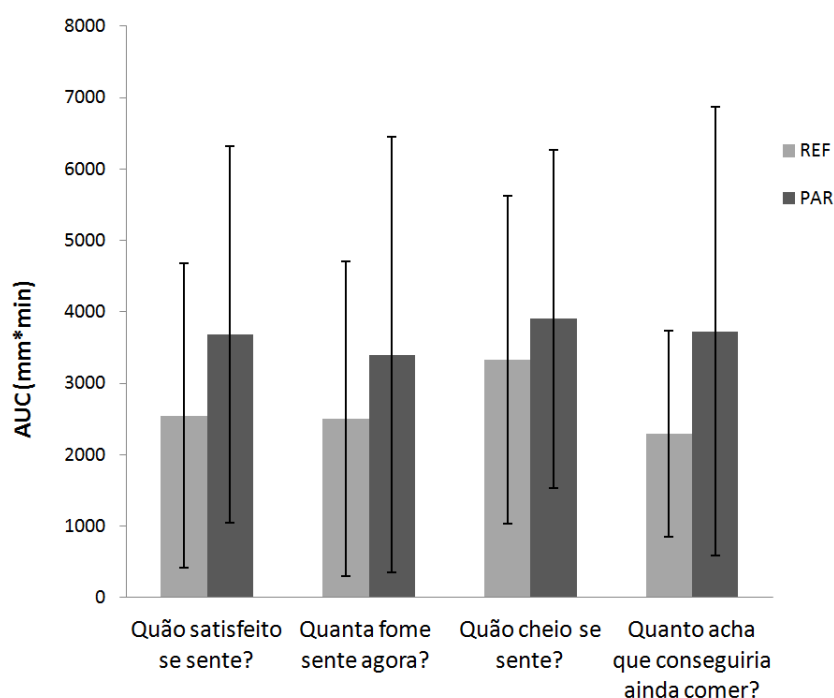
**Tabela 17** – Valores médios da AUC ( $\text{mm} \cdot \text{min}$ ) dos parâmetros de avaliação da percepção de saciedade após ingestão das amostras (REF e PAR)

Parâmetros	REF	PAR
Quão satisfeito se sente?	2544,6 $\pm$ 2130,6 <sup>a</sup>	3680,6 $\pm$ 2632,5 <sup>b</sup>
Quanta fome sente agora?	2501,6 $\pm$ 2202,6 <sup>a</sup>	3398,2 $\pm$ 3051,2 <sup>a</sup>
Quão cheio se sente?	3328,4 $\pm$ 2292,4 <sup>a</sup>	3902,1 $\pm$ 2367,1 <sup>a</sup>
Quanto acha que conseguiria ainda comer?	2288,9 $\pm$ 1444,6 <sup>a</sup>	3724,3 $\pm$ 3143,4 <sup>b</sup>

REF – pão de referência; PAR – pão com elevado teor em AR

Todos os valores representam a média  $\pm$  DP,  $n=37$

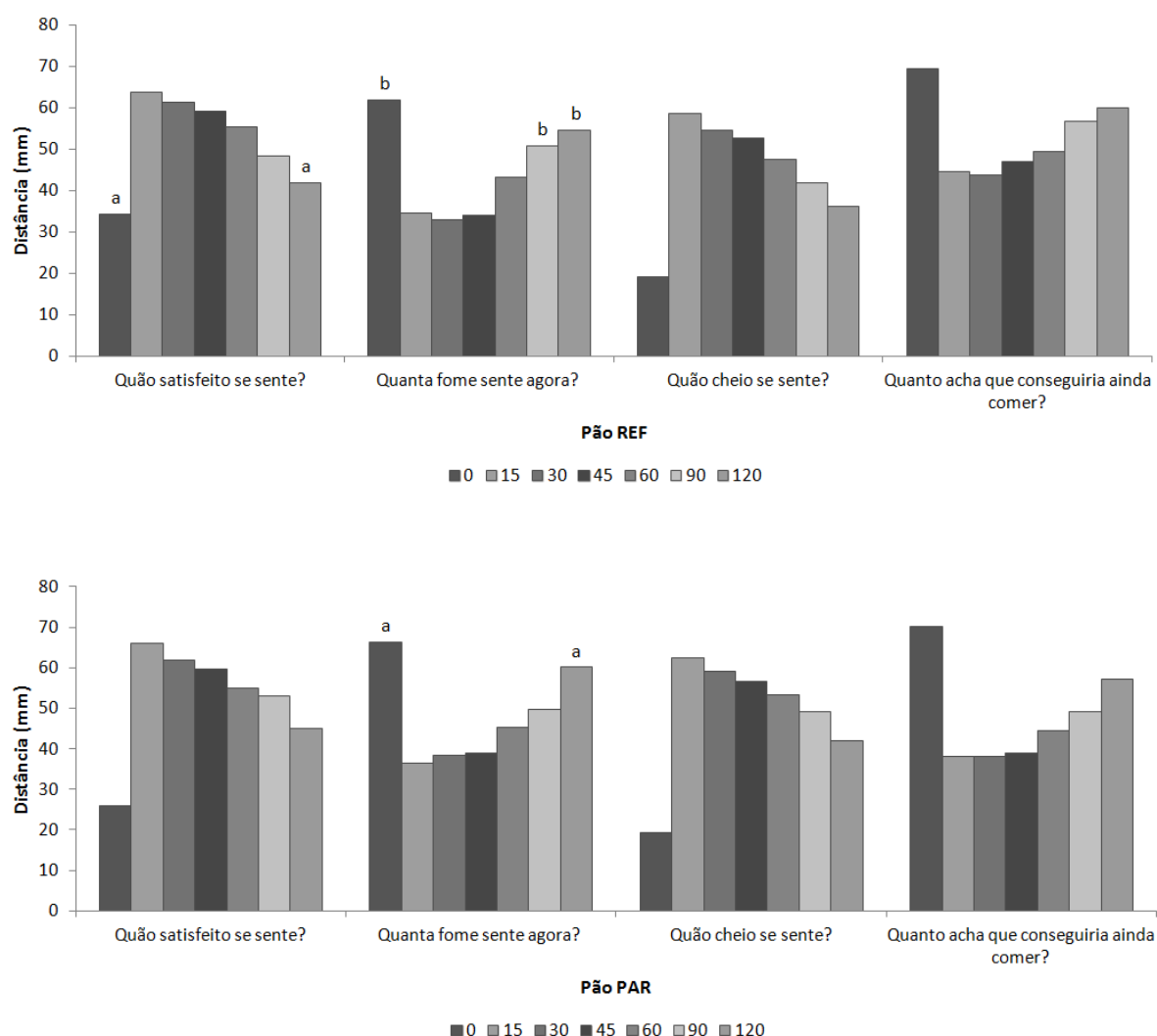
Em cada linha, letras diferentes significam valores significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ )



**Figura 9** – AUC média de cada parâmetro de avaliação da saciedade para as duas amostras (REF e PAR),  $n=37$

É de realçar que todos os parâmetros revelam um aumento da saciedade associada ao pão PAR. A comparação entre as médias da AUC do pão REF e do pão PAR para cada um dos parâmetros foi avaliada pelo teste não paramétrico de *Wilcoxon* para amostras emparelhadas. Foram observadas diferenças significativas para os parâmetros “Quão satisfeito se sente?” ( $P=0,003$ ) e “Quanto acha que conseguiria ainda comer?” ( $P=0,005$ ). Para os parâmetros “Quanta fome sente agora” e “Quão cheio se sente?”, foram observados valores de *p-value* de respetivamente 0,055 e 0,073.

Para cada parâmetro, foi comparada a média dos valores obtidos em cada um dos momentos (15, 30, 45, 60, 90 e 120) com o valor em jejum - Figura 10.

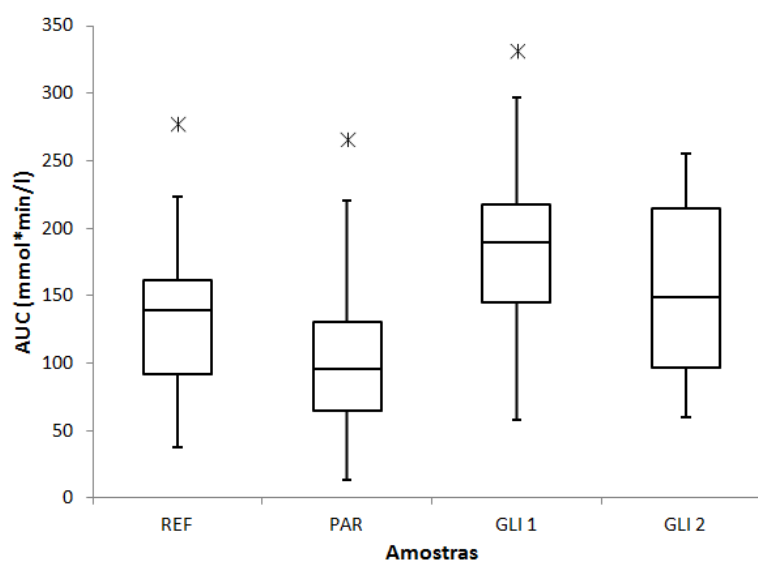


**Figura 10** – Relação dos valores médios de cada um dos parâmetros de avaliação da percepção de saciedade com o valor em jejum (0) para as duas amostras em estudo (REF e PAR),  $n=37$ , letras iguais sobre as barras indicam médias que não apresentam diferenças

Salienta-se que para o pão REF a avaliação relativa à questão “Quão satisfeito se sente?” aos 120 min não apresentou diferenças significativas relativamente à avaliação em jejum. Da mesma forma, a resposta à questão “Quanta fome sente agora?” aos 90 e aos 120 min não apresentou diferenças significativas em relação à avaliação em jejum, para a mesma amostra. Já para a amostra PAR, só esta última questão aos 120 min não apresentou diferenças significativas relativamente à situação em jejum. Estes resultados revelam *scores* de saciedade mais elevados para o pão PAR relativamente ao pão REF

#### 4.4. Determinação do Índice Glicémico do pão com elevado teor em amido resistente e do pão de controlo

O ensaio em duplicado com o alimento de referência (50 g de glicose anidra dissolvida em 250 ml de água) foi realizado em 16 indivíduos saudáveis e normoponderais. Os valores do incremento da AUC para as duas amostras em estudo e para o alimento de referência foram representados na Figura 11.



**Figura 11** – Diagrama de extremos e quartis dos valores de AUC das amostras (REF e PAR) e do alimento de referência, n=16

Nesta versão de diagrama de extremos e quartis é possível identificar *outliers*, e por isso estes valores foram excluídos do cálculo do IG (106, 107).

A aplicação da fórmula referida no ponto 3.4. permitiu o cálculo do IG dos dois pães. O pão REF apresentou um IG de 82 enquanto o pão PAR apresentou um valor de 60. Geralmente os alimentos são classificados como tendo um IG baixo ( $\leq 55$ ), médio (56-69) ou elevado ( $\geq 70$ ). De acordo com esta classificação o pão REF apresenta-se como um alimento de elevado IG e o pão PAR como um alimento de IG médio.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito da fórmula, do tamanho do pão, da cozedura e das condições de conservação na formação de amido resistente no pão de trigo

#### 5.1.1. Influência da formulação

As formulações ensaiadas foram variantes da fórmula base que respeitaram os ingredientes utilizados no fabrico tradicional de pão (farinha de espelta, massa azeda) sem a introdução de compostos estranhos.

A fórmula base (pão REF) apresentou uma razão 1,6 farinha:1 água. A alteração deste valor para 2 farinha:1 água (AGI - menor teor de água na massa) parece diminuir a formação de AR, ao passo que uma diminuição da razão farinha:água para 1,4:1 (AGS - maior teor de água na massa) conduziu a concentrações significativamente mais elevadas de AR. Siljestrom e Asp (60) observaram resultados semelhantes. Estes autores verificaram que a alteração da razão farinha:água de 1,8:1 para 1,4:1 aumentou a formação de AR de 0,9% para 1,1% (peso seco). Johansson *et al.* (59) também detetaram teores mais elevados de AR no interior do pão (humidade mais elevada) do que na crosta exterior (humidade mais baixa), o que é concordante com o presente estudo. A formação de AR é um processo subsequente à gelatinização do amido, ou seja o amido gelatinizado reorganiza-se e forma o AR. Nesta perspetiva, quanto maior a extensão de gelatinização do amido, maior a capacidade de formação de AR. Como a gelatinização do amido ocorre na presença de água, a gelatinização da variante AGS é provavelmente mais extensa do que em AGI, sendo a probabilidade de formação de AR em AGS também mais elevada.

A substituição parcial da farinha de trigo comum por farinha de espelta (25%-E25 e 50%-E50) não aumentou significativamente a concentração de AR do pão, ainda que a farinha de espelta contenha oito a dez vezes mais AR que a farinha de trigo comum. Ademais, um aumento da proporção de farinha de espelta de 25% para 50% também não se manifestou num aumento do teor de AR.

Foram observados resultados semelhantes por outros investigadores. Abdel-Aal observou que na massa de pão fresca preparada exclusivamente com farinha de espelta, o teor de AR era consideravelmente superior do que na massa de pão obtida com farinha

de trigo comum. Após a cozedura dos pães, a concentração de AR apresentou-se muito semelhante: no caso do pão de trigo comum o valor de AR aumentou de 0,4% para 1,2% (peso seco), enquanto no pão de espelta diminuiu de 3,3% para 1,2% (peso seco) (45). Também mais recentemente Angioloni e Collar observaram concentrações semelhantes de AR no pão de trigo comum e no pão de espelta (9 g/kg e 10 g/kg, respetivamente) (46). Estas observações levam-nos a supor que o AR presente na farinha de espelta é do tipo 2 sendo, por isso, pouco rico em amilose o que significa que durante o fabrico do pão sofre gelatinização, torna-se digerível e não origina pães com elevado teor deste componente. O presente estudo poderá ajudar a reforçar esta explicação.

A presença de ácidos orgânicos, nomeadamente ácido láctico, influencia a digestibilidade do amido (114). No pão produzido de forma tradicional, o ácido láctico está presente na “massa azeda” como produto resultante da fermentação das bactérias lácticas presentes naturalmente na farinha. No presente trabalho a presença de ácido láctico quer adicionado diretamente quer através da “massa azeda” não demonstrou ter influência na formação de AR. Liljeberg *et al.* referiram resultados semelhantes em ensaios em pão de cevada (80% farinha integral de cevada e 20% de farinha de trigo) com adição de quantidade semelhante de ácido láctico e “massa azeda” e as mesmas condições de cozedura usadas no presente estudo (114), muito embora a metodologia de doseamento do AR tenha sido muito diferente. Outros investigadores observaram teores mais elevados de AR em pães com adição de ácido láctico e submetidos a cozedura prolongada a baixa temperatura. Liljeberg *et al.* observaram um aumento da concentração de AR de 3,0 para 6,6 % (peso seco) em pão de centeio (70% de farinha integral de centeio e 30 % de farinha de trigo) quando foi adicionado 1,6% de ácido láctico (90 wt%) e cozido a 120°C / 20 h, comparativamente com a mesma fórmula sem adição de ácido láctico e cozido a 200°C / 40 min (115). Hallstrom *et al.* registaram resultados semelhantes observando que a adição de 1,3 % de ácido láctico (90 wt%) em pão produzido com um novo genótipo de trigo com teor elevado de amilose não teve efeito na formação de AR (7% do amido total em ambas as situações) quando cozido a temperatura e tempo usual. O mesmo ensaio modificando apenas as condições de cozedura do pão para 20 h a 120°C evidenciou um aumento do teor de AR (13% sem adição de ácido láctico e 19 % com adição deste composto) (44).

Segundo Liljeberg *et al.* a presença de ácido láctico parece promover a retrogradação do amido durante a cozedura a baixa temperatura por um longo período de tempo. Nes-

tas condições, a atividade das amilases é mais prolongada provocando um maior grau de linearização da amilopectina que por sua vez induz mais reações de retrogradação aumentando o conteúdo em AR. Por outro lado a linearização da amilopectina também é estimulada pela presença de ácido láctico (115).

Um estudo mais recente referiu que a presença de ácido láctico durante a cozedura prolongada a baixa temperatura pode induzir interações entre o amido e o glúten e assim incrementar a formação de amido de digestão lenta ou mesmo resistente à ação das enzimas (44).

Em Portugal, o fabrico de pão com a utilização de “massa azeda” é muito comum, mesmo à escala industrial. Estes pães são geralmente designados de “pão caseiro, tradicional, rústico, etc.” e conotados como mais saudáveis. Neste trabalho verificámos que a utilização de “massa azeda” não influencia a formação de AR, quer pelo aumento do conteúdo em ácido láctico, quer por influência de outros componentes presentes na “massa azeda”. A presença de ácido láctico parece importante quando a cozedura do pão ocorre a baixa temperatura por longo tempo mas não se revela promotora da formação de AR à temperatura e tempo usuais de cozedura do pão.

### **5.1.2. Influência do tamanho do pão e das condições de cozedura**

O elevado teor de AR no pão de maior dimensão está relacionado, provavelmente, com a quantidade de água e com a temperatura de cozedura. No interior dos pães de maior dimensão o teor de humidade é mais elevado e não são atingidas temperaturas tão altas durante a cozedura como acontece nos pães de menor dimensão. Estes dois fatores - a elevada humidade e a baixa temperatura no centro do pão de maiores dimensões - promovem a formação de AR. Apesar de não serem conhecidos estudos em que se testou o tamanho do pão, estes resultados são concordantes com os obtidos quando se altera a razão farinha:água e/ou a temperatura de cozedura (59, 60).

A cozedura prolongada a baixa temperatura influencia significativamente a formação de AR. Os resultados do presente trabalho são concordantes com os obtidos por Liljeberg *et al.* (115) em pão de centeio integral (3,0% vs 5,4% do amido total), Akerberg *et al.* (43) em variedades de pão de cevada integral, produzidos com génotipos diferentes relativamente à relação amilose/amilopectina (0,6% a 3,5% vs 2,5% a 10,3% do amido total), Yadav (62) em pão de trigo (2,6% vs 4,2% peso seco) e Hallstrom *et al.* (44) em pão

de trigo integral com teor elevado de amilose (1,2% vs 2,9% peso seco). Estes autores observaram que os pães cozidos a 120°C durante 20 h evidenciam teores de AR significativamente superiores quando comparados com pães cozidos a temperaturas mais elevadas durante menos tempo.

Estas condições de cozedura prolongada (120°C/20h) são idênticas às utilizadas num pão de centeio integral, muito popular durante séculos no Norte da Europa – o “*pumpernickel bread*”. Jenkins *et al.* como citado em Liljeberg *et al* (115) observaram que, após a ingestão de “*pumpernickel bread*”, o efluente de indivíduos ileostomizados apresentou concentrações muito mais elevadas de AR. O elevado teor de AR deve-se quer ao aumento da retrogradação da amilose, quer à linearização da amilopectina seguida de retrogradação durante o processo de cozedura prolongada a baixa temperatura, mesmo sem a presença de ácido láctico (115).

Outro estudo de Eerlingen *et al.* demonstrou que a conservação de uma solução de amido gelatinizado a 100°C apresenta um teor de AR superior comparativamente à conservação da mesma solução a 0°C ou a 68°C. Após um período inicial de aproximadamente 150 min, a formação de AR aumenta exponencialmente (131). Relacionando estes resultados com o processo de cozedura do pão “*pumpernickel bread*”, o interior do pão atinge valores próximos dos 100°C aproximadamente uma hora após ser colocado no forno (43), o que significa que provavelmente ocorrerá um aumento expressivo do AR durante as 20 h em que é mantido a 120°C.

No presente estudo, a cozedura a 150°C e a 120°C decorreu nas mesmas condições que os restantes ensaios, ou seja, o pão moldado e fermentado foi colocado sobre tabuleiro e introduzido no forno. Nestas condições não foi possível prolongar para além das 3 e 4 h, respetivamente, o tempo de cozedura. Contudo, observámos que a exposição a 150°C durante 3 h favoreceu significativamente a formação de AR e a 120°C durante 4 h o aumento ainda foi maior (15% e 24% de aumento, respetivamente, relativamente ao controlo). Na 2ª fase deste trabalho, foram desenvolvidas metodologias de forma a prolongar para além das 4 h o tempo de cozedura a 120°C, com o objetivo de obter um pão com teor mais elevado de AR.



### 5.1.3. Influência das condições de conservação

A conservação à temperatura ambiente durante 3 e 5 dias revelou ter um efeito significativo na formação de AR. Estes resultados coincidem com os apresentados por Yadav que comprovou um aumento significativo de 25% relativamente a um controlo, após a conservação durante 96 h à temperatura ambiente (62). Eerlingen *et al.* observaram também um aumento significativo do teor de AR após 7 dias de conservação, nas mesmas condições do estudo anterior. Este aumento parece dever-se à retrogradação da amilopectina (40).

Outros estudos, em pão de milho, reportaram que a conservação aumentou o teor de AR até aos 4 dias e particularmente a 4°C. A conservação a -20°C foi a condição que conduziu a teores mais baixos. Estas observações evidenciam um processo de reversibilidade na retrogradação da amilopectina (42). Estes resultados estão em concordância com os do presente estudo em que foram observados os valores mais baixos de AR na conservação a -20°C e a diminuição dos valores de AR dos 5 para os 7 dias a todas as temperaturas.

Estudos anteriormente desenvolvidos por Johansson *et al.* (59), Siljestrom e Asp (60) e Berry (61) referem que a formação do AR ocorre no processo de cozedura e no posterior arrefecimento do pão, não ocorrendo alterações significativas durante a conservação quer à temperatura ambiente quer em condições de refrigeração. O presente estudo contraria estes resultados.

A conservação do pão à temperatura ambiente como estratégia para aumentar o seu teor em AR não é aceitável por parte do consumidor que privilegia o pão acabado de cozer. Atualmente é usual a comercialização de pão pré-cozido congelado que é submetido a cozedura final no próprio local onde é vendido ao público de forma a ser servido ainda quente, sendo esta uma prática que não promove a formação de AR. Por oposição, a forma artesanal de preparação do pão – uma vez por semana em forno de lenha onde permanecia durante longo tempo a temperatura relativamente baixa – é consentânea com a formação de AR. O pão produzido desta forma era consumido durante vários dias durante os quais ocorria, provavelmente, um aumento do teor de AR. Presumivelmente, a alimentação dos dias de hoje tem um aporte de AR proveniente do consumo do pão inferior ao que já teve em gerações anteriores.

## 5.2. Desenvolvimento de um pão com elevado teor em amido resistente

Os primeiros ensaios com o objetivo de prolongar o tempo de cozedura do pão à temperatura de 120°C consistiram em simular as condições do pão “*pumpernickel bread*” descritas por Liljeberg *et al.* (115) em pão de centeio integral, Akerberg *et al.* (43) em pão de cevada integral e Hallstrom *et al.* (44) em pão de trigo integral, ou seja, colocar o pão em forma tapada com duas folhas de papel de alumínio e cozer em forno a 120°C durante 20 h. Yadav (62) também refere efetuar a cozedura de pão de trigo elaborado com farinha refinada durante 20 h a 120°C, mas não especifica as condições em que o fez. Os resultados deste ensaio não constam do ponto 4.2. pois não foi possível efetuar qualquer determinação analítica. Resultou num produto com um teor de humidade muito baixo, com uma textura muito dura que não correspondeu minimamente às características de um pão. A cozedura nestas condições parece ser suportada por pães preparados com farinhas integrais, com maior capacidade de retenção de água. Com farinha de trigo comum não nos parece possível aplicar as condições de cozedura características do pão “*pumpernickel bread*”.

A estratégia adotada de seguida foi a de monitorizar a perda de água durante a cozedura que permitiu encontrar um tempo de cozedura a 120°C de 7 h.

O aumento de 24% no teor de AR verificado no ensaio anterior (120°C/4 h) foi ultrapassado largamente com mais 3 h de cozedura (1,46 vs 3,77). Este facto está de acordo com o aumento exponencial na formação de AR observado numa solução de amido gelatinizado mantido à temperatura de 100°C, após um período de latência inicial de 150 min, registado por Eerlingen *et al.* (131).

A formação de AR está estreitamente relacionada com o teor de humidade do pão. A cozedura a 120°C durante 3 h originou um pão com um reduzido teor de humidade (22.2%), fator que não promoveu a formação de AR como anteriormente explicado. A preparação da fórmula AGS (1,4 farinha:1 água) e a cozedura em forma fechada reduziu a perda de água, promovendo a gelatinização do amido e consequentemente a formação de AR. Os pães obtidos desta forma, PAR(T) e PAR(M), apresentaram teores de humidade de 43,6 e 43,7%, respetivamente, o que se revela, só por si, um fator promotor da formação de AR.

A preparação da variante PAR(M) com substituição parcial da farinha de trigo por farinha de milho teve como objetivo promover um aumento adicional no teor em AR. Akerberg *et al.* referem os valores mais elevados em pão de cevada elaborado com farinha rica em amilose e submetido a cozedura prolongada a 120°C. O mesmo procedimento utilizando farinha com teores de amilose comum apresentam teores de AR mais baixos (6,2 vs 10,3 % do amido total).

Tendo em conta que a farinha de milho é muito rica em amilose e que a amilose é o principal componente do amido que sofre retrogradação, a introdução parcial de farinha de milho apresenta-se como um fator promotor da formação de AR. De facto, a substituição de 20% de farinha de trigo por farinha de milho revelou aumentar em 15% o teor de AR. Relativamente ao pão REF (1,18% peso seco) esta fórmula otimizada apresentou 3,7 vezes mais AR (4,33% peso seco). Em percentagem do amido total este valor significa cerca de 5% e o AR é essencialmente do tipo 3.

Em síntese, a variante AGS (1,4 farinha:1 água), com substituição de 20% de farinha de trigo por farinha de milho submetida a cozedura a 120°C durante 7 h em forma fechada apresentou-se como a formulação que revelou o teor em AR mais elevado, sendo designado como pão com elevado teor em amido resistente - PAR. Este pão apresenta um teor de AR de 2,4 g /100 g de pão.

Os trabalhos de investigação publicados nesta área referem dois tipos de cozedura, a cozedura habitual a 200°C durante 30 a 40 min e a cozedura nas condições usadas no pão “*pumpernickel bread*” (120°C durante 20 h). Não são conhecidos estudos em pão de trigo comum que efetuem a cozedura do pão a 120°C durante um intervalo de tempo superior a 40 min com o objetivo de fomentar a formação de AR, como realizado no presente trabalho. No entanto esta metodologia revelou-se a forma mais eficaz de aumentar o teor de AR no pão de trigo.

No presente trabalho pretendeu-se promover a formação do AR respeitando os ingredientes utilizados usualmente no fabrico de pão ainda que os teores de AR obtidos não sejam tão elevados como poderiam ser com recurso ao AR como ingrediente. Poderia ser conseguida uma formulação de pão com um teor em AR mais elevado incluindo na fórmula o ingrediente AR comercializado por diversas empresas. Esta seria uma metodologia mais fácil na medida em que bastaria substituir parte da farinha de trigo pelo ingrediente comercial numa proporção de 1:1.

O estudo no âmbito do projeto EpiPorto estimou um consumo médio diário de pão pela população portuguesa de 125 g (121). A ingestão de pão PAR significaria um contributo diário de 3,0 g de AR vs 1,0 g no caso do pão REF. Em Portugal não existe uma recomendação oficial relativa ao consumo de pão mas em alguns países europeus é recomendado o consumo mínimo diário de 250 g deste alimento (134). Nestes países poderemos estimar que a ingestão de pão PAR significaria um contributo diário mínimo de 6 g de AR enquanto a ingestão de pão REF seria de 2 g diários deste componente. O valor recomendado para que os efeitos benéficos sejam evidentes é de 20 g/dia contudo o pão não é a única fonte de AR, fazem parte da alimentação diária outros alimentos ricos neste composto.

A caracterização do pão PAR e do pão REF permitiu determinar a dose de cada uma das amostras que contém 50 g de hidratos de carbono e que será a dose de referência para o ensaio *in vivo* que se seguiu: 88 g para o pão REF e 102 g para o pão PAR.

Outros trabalhos de investigação testaram a substituição total ou parcial da farinha de trigo por outras farinhas. Sanz-Penella *et al.* ensaiaram o amido de ervilha e referem que a substituição até 20% se mostrou aceitável pelo consumidor, permitindo um aumento do teor em AR de 0,7% para 5,1% (peso seco) (48). Também a farinha de banana verde foi testada como substituto da farinha de trigo na preparação de pão. Pacheco-Delahaye *et al.*, verificaram que a substituição de 7% de farinha de trigo por farinha de banana produziu um pão semelhante ao pão exclusivamente de trigo no que diz respeito a odor, sabor, cor e textura. O teor de AR apresentou um modesto aumento de 0,2 g para 0,7 g/100 g de pão mas a substituição de 20% de farinha de trigo por farinha de banana conduziu a um pão com um teor de AR de 2,35 g/100 g de pão, contudo com menor aceitabilidade nas provas sensoriais (49). Ainda com a farinha de banana verde, Juarez Garcia *et al.* ensaiaram a substituição total da farinha de trigo na formulação de um pão. O produto obtido apresentou um teor em AR de 6.7% vs 1.05% (peso seco) no pão controlo. Nada é referido sobre a aceitabilidade deste pão pelo consumidor (50). Angioloni e Collar realizaram vários ensaios com farinha de aveia, Kamut®, espelta, centeio, trigo sarraceno e misturas multi-cereais. Kamut® e espelta não revelaram aumento significativo no teor de AR relativamente ao pão de trigo. A aveia, o centeio e o trigo sarraceno mostraram teores de AR cerca de 4,5 vezes mais comparativamente ao pão de trigo. A combinação multi-cereais que demonstrou melhor aceitabilidade por parte do painel de provadores foi

aveia/centeio/trigo sarraceno/trigo comum (20/20/20/40) com um teor em AR de 3,2 g/100 g de pão vs 0,9 g/100 g de pão controlo (pão de trigo)(46). Tradicionalmente, em Portugal, o centeio é frequentemente utilizado na panificação, a aveia e o trigo sarraceno apresentam-se como opções que seria interessante estudar.

Outro aspeto seria testar outras combinações, algumas não usuais na panificação, como por exemplo as farinhas de grão-de-bico, feijão, lentilhas ou tremço e investigar o seu contributo para a formação de AR no pão. Estas farinhas provenientes de leguminosas são isentas de glúten e ricas em AR e poderão ser utilizadas em formulações às quais se adicione o glúten como ingrediente de forma a manter as características de textura do pão ou, em alternativa, obter formulações de pães com baixo conteúdo em glúten, com uma textura mais densa, podendo no entanto ter boa aceitação pelo consumidor. Com base no presente estudo, a cozedura longa a baixa temperatura destas possíveis formulações, será um fator promotor da formação de AR e, eventualmente, o produto final obtido poderá cumprir os requisitos de aplicação da alegação nutricional e de saúde relativa a este componente, definida na respetiva legislação (79).

### **5.3. Efeito da ingestão de pão com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica, insulínica e na saciedade de indivíduos não diabéticos**

O ensaio *in vivo* realizado testou o efeito da ingestão do pão desenvolvido no presente trabalho - o pão PAR - face ao pão REF que serviu de controlo. A dose de cada um dos pães continha 50 g de HC disponíveis pelo que o ensaio avaliou o efeito do AR na resposta glicémica a quantidades equivalentes de HC. A dose de pão REF (88 g) continha 0,7 g de AR enquanto a dose de pão PAR (102 g) continha 2,5 g de AR.

Os participantes do ensaio foram divididos em dois grupos, o grupo N que incluiu os indivíduos normoponderais (16) e o grupo E com indivíduos com excesso de peso (16) e obesidade (5). A comparação das respostas dos dois grupos nas diferentes avaliações - resposta glicémica, insulínica e perceção da saciedade - revelou não existir diferenças significativas entre N e E. Apesar de ser um fator que inicialmente nos pareceu interessante estudar, os critérios para aceitação dos voluntários no ensaio, nomeadamente a ausência de diagnóstico de diabetes *mellitus* e de distúrbios relacionados com o metabolismo glicídico, poderão justificar a ausência de diferenças entre os grupos. Provavelmen-

te, os critérios de aceitação dos voluntários no estudo tiveram um efeito mais determinante nos resultados obtidos do que o simples valor do IMC que decidiu a divisão em grupos.

### 5.3.1. Resposta glicêmica

A curva média da variação da glicemia pós-prandial para o pão REF e para o pão PAR apresentou valores máximos muito semelhantes, no grupo N (Figura 3), no grupo E (Figura 4) e para o conjunto dos indivíduos (Figura 5). Com exceção do grupo E para o pão REF em que o valor máximo ocorreu aos 45 min, o valor máximo em todas as outras situações ocorreu aos 30 min e o valor do pão PAR foi ligeiramente superior, embora sem significado estatístico. Independentemente da quantidade de AR presente, a resposta glicêmica até aos 30 min é idêntica para as duas doses de pão com igual quantidade de HC disponíveis. A partir dos 45 e até aos 120 min, observaram-se valores de glicemia progressivamente mais baixos em que foi notório a redução mais acentuada no caso do pão PAR relativamente ao pão REF. A comparação dos valores médios nos vários momentos indicou valores significativamente mais baixos para o pão PAR aos 60, 90 e 120 min.

A resposta glicêmica expressa em média da AUC para cada uma das amostras ensaiadas também revelou valores significativamente mais baixos para o pão PAR que para o pão REF.

Os resultados permitem sugerir que o AR influencia a digestibilidade da fração de amido disponível, especialmente a partir dos 45 min após a ingestão da refeição. Estes resultados são concordantes com os observados por Hallstrom *et al.* que compararam a resposta glicêmica a porções equivalentes de pão (50 g HC) com diferentes conteúdos em AR: 1,5 g (controlo), 4,8 g e 7,7 g. Estes autores observaram um valor de AUC (0-120) significativamente mais baixo para a amostra com 7,7 g (13,0% amido total) relativamente ao controlo. A amostra com 4,8 g (8,7% amido total) não revelou diferenças significativas relativamente ao controlo mas importa salientar que esta amostra foi produzida com farinha de trigo integral contendo, além do AR, outros tipos de fibra que poderão ter influenciado a resposta glicêmica (44). Os estudos de Klosterbuer *et al.* também com AR3 investigaram o efeito da adição de AR numa refeição mantendo constantes os restantes nutrientes. Estes autores referiram uma diminuição significativa da AUC (0-180) na refeição suplementada com 25 g de AR (81). Akerberg *et al.* compararam três amostras de

pão: amostra de referência com 0,2% (amido total), amostra com 3,5% e pão com 10,3% de AR. Só a última amostra revelou diferenças significativas relativamente ao pão de referência. Neste último estudo as amostras de pão foram incluídas numa refeição com alimentos ricos em gordura e proteína (43). É possível especular que o efeito na diminuição da resposta glicémica seja influenciado pelos restantes componentes da refeição.

O pão PAR do nosso estudo, produzido exclusivamente com farinha refinada de trigo e de milho, apresentou um teor de 2,4 g de AR/100 g de pão, valor este que é baixo relativamente a concentrações ensaiadas nos estudos referidos. No entanto, o efeito do AR foi evidente nas condições do nosso ensaio e demonstrou ter um efeito positivo na resposta glicémica, nomeadamente influenciando a digestibilidade do amido disponível.

O possível mecanismo pelo qual o AR influencia a digestibilidade da fração de amido disponível será discutido em conjunto com os resultados da insulina e da saciedade. Seria interessante prolongar além dos 120 min a monitorização da glicémia capilar de forma a perceber ao fim de quanto tempo se registariam valores semelhantes aos da linha do jejum.

### **5.3.2. Resposta insulínica**

A monitorização da insulinémia foi efetuada em dois momentos, em jejum e 30 min após a ingestão do pão em teste. Todas as avaliações foram efetuadas em sangue capilar sendo que para o doseamento da insulina foi necessário a recolha de uma amostra de sangue de no mínimo 100 µl. O processo de colheita capilar para este fim torna-se doloroso para o participante e nem sempre bem sucedido, facto este que foi tido em conta na decisão de monitorizar a insulina apenas em dois momentos.

Tal como anteriormente referido não foram detetadas diferenças significativas entre os dois grupos: 30 min após a ingestão das duas amostras a resposta insulínica não foi significativamente diferente entre o pão REF e o pão PAR, apresentando o pão PAR um valor médio ligeiramente superior. O incremento médio do valor entre as avaliações aos 30 min e em jejum também não apresentou diferenças estatisticamente significativas (Figura 7).

A produção de insulina está diretamente relacionada com a concentração de glicose no sangue. Até aos 30 min as curvas da glicémia para os dois pães foram semelhantes pelo que a resposta insulínica também não diferiu significativamente. O valor ligeiramen-

te superior da glicemia do pão PAR aos 30 min foi traduzido no valor da insulinemia também ligeiramente superior para esta amostra. Não deverá ser excluída a possibilidade de a resposta insulínica até aos 120 min poder apresentar diferenças significativas entre os dois pães.

Akerberg *et al.* não encontraram diferenças significativas entre a resposta insulínica (0-120 min) numa amostra de pão de trigo comum com 0,2 g de AR/100 g amido total, uma amostra de pão de cevada com elevado teor em amilose e cozedura convencional (3,5 g de AR) e uma terceira amostra de pão de cevada com elevado teor em amilose cozida a 120°C durante 20 h (10,3 g de AR) (43). Hallstrom *et al.* também não observaram diferenças significativas entre os vários produtos testados que incluíam pão preparado com farinha de um novo genótipo de trigo mais rico em amilose (7,7 g de AR por porção), pão preparado com farinha de trigo integral (4,8 g de AR por porção), ambos cozidos a 120°C durante 20 h e pão controlo cozido de forma convencional (1,5 g de AR). Este último estudo monitorizou a insulina até aos 180 min (44). Klosterbuer *et al.* só encontraram diferenças significativas numa refeição suplementada com 20 g de AR e 5 g de pululano<sup>6</sup>. Neste mesmo trabalho a suplementação com 25 g de AR não apresentou diferenças significativas na insulinemia até aos 180 min (81).

### 5.3.3. Perceção da saciedade

A capacidade de um determinado alimento ou refeição induzir saciedade tem uma importância determinante na quantidade que se ingere e no intervalo de tempo até à refeição seguinte. Estas duas variáveis podem influenciar substancialmente a ingestão alimentar e determinar o equilíbrio do balanço energético.

A avaliação da perceção de saciedade é um processo que se reveste de uma grande subjetividade. O fator “indivíduo” na sua complexidade e variedade é fundamental quando se pretende quantificar sensações, além da multiplicidade de fatores externos (físicos, psicológicos e ambientais) que influenciam o indivíduo e consequentemente a perceção dessas mesmas sensações. Flint *et al.* publicaram escalas visuais analógicas validadas para avaliação da sensação de apetite que adotámos no presente trabalho, tendo sido traduzidas o mais fielmente possível de forma a não alterar o significado das questões (101).

---

<sup>6</sup> O pululano é um polissacárido não metabolizável pelo organismo que é produzido por um fungo a partir do amido. É solúvel em água e forma uma solução viscosa quando dissolvido.



Das quatro questões constantes no inquérito (Apêndice 5), as questões “Quão satisfeito se sente?” e “Quão cheio se sente?” apresentaram um comportamento semelhante, ou seja, em jejum foram indicados *scores* baixos (preenchimento próximo do extremo esquerdo) e 15 min após a ingestão foram observados os *scores* mais elevados que, progressivamente, foram diminuindo até aos 120 min. Relativamente às outras duas questões “Quanta fome sente agora?” e “Quanto acha que conseguiria ainda comer?” observou-se o comportamento oposto: *scores* elevados em jejum seguidos dos *scores* mais baixos aos 15 min que, progressivamente, foram aumentando até aos 120 min.

O pão PAR revelou, de forma constante, *scores* relacionados com níveis mais elevados de saciedade (Figura 8). Esta diferença é bem evidente no que diz respeito ao parâmetro “Quão satisfeito se sente?” em que a comparação de médias do incremento dos *scores*, registados para os diferentes momentos de avaliação (15, 30, 45, 60, 90 e 120), apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o pão REF e o pão PAR. Nos parâmetros “Quão cheio se sente?” e “Quanto acha que conseguiria ainda comer?” foram observadas diferenças significativas aos 90 e 120 mins e aos 45 e 90 min, respetivamente. Estes resultados traduzem estados de maior saciedade para o pão PAR.

A comparação da AUC das duas amostras de pão estudadas, para cada um dos parâmetros, permitiu estimar a resposta global desde a situação de jejum até aos 120 min (Figura 9). Neste caso, observámos valores significativamente mais elevados para “Quão satisfeito se sente?” e para “Quanto acha que conseguiria ainda comer?”. Salienta-se que para este último parâmetro, um valor mais elevado de AUC significa que foram preenchidos *scores* mais baixos. Também para os parâmetros “Quanta fome sente agora?” e “Quão cheio se sente?” os valores de AUC são mais elevados embora sem significado estatístico. O parâmetro “Quanta fome sente agora?” tem uma leitura semelhante ao parâmetro “Quanto acha que conseguiria ainda comer?”. *Scores* mais baixos traduziram-se em AUC mais elevadas.

Com o objetivo de perceber quão duradoura é a sensação de saciedade e se existem diferenças entre os dois pães foram testadas as diferenças entre os dados obtidos em cada um dos momentos de recolha (15, 30, 45, 60, 90 e 120) e os dados observados em jejum para cada um dos pães e para cada parâmetro (Figura 10). Os resultados confirmaram a capacidade de induzir maior saciedade do pão PAR relativamente ao pão REF. Para o pão PAR, só para o parâmetro “Quanta fome sente agora?” e após 120 min são referi-

dos *scores* que não diferem significativamente dos referidos em jejum. Já para o pão REF, no parâmetro “Quão satisfeito se sente?” aos 120 min e no parâmetro “Quanta fome sente agora?” aos 90 e aos 120 min foram observados *scores* que não diferiram significativamente dos registados em jejum.

A comparação dos nossos resultados com a bibliografia publicada torna-se difícil e pouco credível devido à diversidade de metodologias encontradas: são testados diferentes tipos de AR, os desenhos dos estudos são diferentes, as ferramentas de recolha dos dados não são idênticas e o alimento ou refeição onde foi incluído o AR nunca é semelhante. Numa avaliação como a perceção da saciedade já por si tão subjetiva, a comparação com estudos tão diferentes pareceu-nos pouco válida.

O pão PAR com um teor em AR de 2,4 g/100 g revelou uma resposta glicémica pós-prandial significativamente inferior e simultaneamente induziu maior saciedade que o pão REF. Este efeito é característico de alimentos ricos em fibra alimentar sendo que o AR é considerado um componente deste grupo. Vários autores explicam o aumento da saciedade associado a alimentos com incremento do teor de fibra pelo atraso do esvaziamento gástrico e da absorção dos macronutrientes o que explica os resultados do presente estudo. O aumento da produção de hormonas gastrointestinais que atuam como indutores da saciedade, como a colecistoquinina, GLP-1 e peptídeo tirosina-tirosina, também poderá explicar este efeito após a ingestão de alimentos ricos em fibra (92, 98, 99). No nosso estudo, as duas amostras ensaiadas, e no que diz respeito aos componentes da fibra, diferiam apenas no teor de AR pelo que poderemos afirmar que o efeito indutor da saciedade observado se deve a este composto. Será legítimo também afirmar que numa situação *ad libitum* seria ingerida uma porção de pão PAR inferior ao pão REF, provocando uma resposta glicémica mais baixa e uma ingestão energética inferior, o que poderá ser importante numa situação de perda de peso, manutenção de peso ou mesmo na diabetes.

#### **5.4. Determinação do Índice Glicémico do pão com elevado teor em amido resistente e do pão controlo**

No presente estudo foi calculado um IG de 82 para o pão REF. Este valor corresponde a um IG elevado sendo concordante com a maioria dos valores indicados por Atkinson

et al. (133) para pão de trigo com farinha refinada. O pão PAR desenvolvido no nosso estudo apresentou um IG de 60, o que é consentâneo com um alimento de médio IG.

O IG inferior do pão PAR é o resultado da resposta glicêmica menor que este pão desencadeou. Dado que os dois pães se diferenciam essencialmente pelo teor em AR que apresentam será lícito afirmar que o AR contribuiu para a diminuição do IG do pão. Um pão com um teor em AR de 2,4% tem um IG inferior a um pão com 0,8% neste mesmo componente. Atendendo ao conceito de IG, e tendo em conta a semelhança das matérias-primas utilizadas no fabrico dos dois pães, poderemos reforçar a ideia já antes apresentada de que a presença do AR tem efeitos benéficos na qualidade nutricional dos restantes HC disponíveis do alimento, neste caso do pão.



## **6. CONCLUSÕES**

Os resultados do presente estudo permitem afirmar que:

- 1) Foi possível aumentar significativamente o teor de AR do pão de trigo modificando a proporção dos ingredientes que tradicionalmente são usados e/ou as condições de processamento: a) um teor elevado de humidade na massa (1,4 farinha:1,0 água) induziu um aumento de 18% relativamente à fórmula de referência (1,6 farinha:1,0 água); b) um pão com aproximadamente 400 g apresentou mais 14% que um pão com 70 g; c) a cozedura a 120°C durante 4 h aumentou o teor de AR em 24% relativamente às condições usuais de cozedura (200°C/30 min.) e d) a manutenção do pão à temperatura ambiente ( $\approx 22^{\circ}\text{C}$ ) durante 3 dias parece ser a forma de conservação que promoveu um maior aumento do teor de AR (26%). Nesta última situação é necessário ter em conta a aceitabilidade do produto pelo consumidor.
- 2) Um pão de dimensão grande ( $\approx 400$  g), preparado com uma proporção de 1,4 farinha:1,0 água e submetido a cozedura a 120°C durante 7 h apresentou um teor de AR de 3,77% (peso seco). A substituição de 20% de farinha de trigo por farinha de milho na fórmula anterior originou um pão com um teor em AR ainda mais elevado (4,33% em peso seco que equivale a 2,4 g de AR / 100 g de pão). Pães unitários de 70 g preparados com uma proporção de 1,6 farinha:1 água, exclusivamente com farinha de trigo e submetido a cozedura a 200°C durante 30 min apresentam um teor de AR de 1,18% (peso seco) ou 0,8 g/100 g de pão.
- 3) No ensaio *in vivo* efetuado em indivíduos saudáveis não diabéticos normoponderais e com excesso de peso/obesidade foram observados valores de glicémia estatisticamente inferiores após a ingestão do pão PAR comparativamente ao pão REF aos 60, 90 e 120 min. A resposta glicémica expressa em AUC (0-120 min.) apresentou valores significativamente mais baixos para o pão PAR (127,15 mmol\*min/l) que para o pão REF (153,77 mmol\*min/l), ingeridos em doses equivalentes de HC disponíveis. Estes resultados permitem sugerir que um teor de AR de 2,4% influencia a digestibilidade da fração de amido disponível em pão.
- 4) A resposta insulínica até aos 30 min não apresentou diferenças significativas entre os dois pães estudados. Admitimos que a monitorização da insulinémia até aos 120 min

mostraria resultados diferentes entre os dois pães pelo facto de que na resposta glicémica, só após 45 min terem sido observados comportamentos distintos entre as duas amostras.

5) O pão PAR induziu maior saciedade que o pão REF. Sugere-se que este efeito seja devido ao AR presente em maior quantidade no pão PAR e que a introdução deste pão na dieta poderá traduzir-se na ingestão de uma porção de pão inferior (menor conteúdo de HC disponíveis) relativamente ao pão REF.

6) O IG do pão PAR apresentou um valor de 60 correspondendo a um alimento de médio IG enquanto o pão REF manifestou um valor de 82 (elevado IG).

A alteração do teor de AR no pão de 0,8 para 2,4% poderá conduzir a claros benefícios para a saúde e a formulação desenvolvida poderá constituir uma boa escolha alimentar no contexto de uma alimentação saudável para indivíduos não diabéticos.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O interesse crescente por novos alimentos motiva a indústria alimentar a procurar constantemente novas substâncias que possam tornar os alimentos mais equilibrados e também com um valor comercial acrescido. Entre os diferentes componentes da fibra alimentar, o AR apresenta-se como um composto muito interessante na medida em que aumenta o teor de fibra do alimento, conferindo diversos benefícios para a saúde. Oferece ainda a vantagem de não ter inconvenientes organoléticos, de textura e de formulação, que revelam as fibras tradicionais. Os alimentos enriquecidos em AR apresentam-se com melhor paladar e aceitabilidade por parte do consumidor que os alimentos suplementados com outras fibras dietéticas.

Quer os alimentos naturalmente ricos em AR, quer os que sofreram a adição deste ingrediente, vão ser submetidos a variados processamentos e métodos de confeção antes de serem ingeridos. Estes tratamentos interferem com o teor de AR, originando por vezes aumento ou redução, dependendo do tipo de amido e do processo utilizado. No caso concreto do pão é possível obter um pão enriquecido em AR, com evidentes benefícios na saúde, introduzindo unicamente alterações no processo de fabrico, como sugere o presente estudo. Seria interessante ensaiar outros ingredientes, menos comuns na panificação, e que são identificados como ricos em AR, nomeadamente as leguminosas (ervilha, grão-de-bico, feijão, lentilhas, tremço, etc) e trigo sarraceno. Também a utilização do ingrediente AR, em especial o AR3 por ser mais estável, poderá ser uma boa opção para a indústria alimentar. Existem atualmente no mercado várias marcas comerciais de AR que são obtidas a partir do amido de milho rico em amilose ou de maltodextrinas da tapioca.

Relativamente à formulação desenvolvida no presente trabalho o efeito do AR foi evidente nas condições ensaiadas ou seja, ingestão exclusiva de dose de pão acompanhada por 250 ml de água. De uma forma geral o pão é acompanhado por outros alimentos pelo que seria interessante perceber se o efeito será semelhante no contexto de uma refeição e ainda se o aumento da saciedade se traduz na ingestão de uma dose inferior.

O método de doseamento do AR também tem sido alvo de vários trabalhos de investigação (58). O método preconizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e pela *American Association of Cereal Chemists* (AACC) tem sido utilizado recen-

temente pelos investigadores. No entanto, é necessário ter alguma prudência quando se comparam trabalhos em que os resultados foram obtidos por métodos diferentes.

A EFSA reconheceu, em 2011, o AR como ingrediente funcional. Na sequência desse parecer o Regulamento 432/2012 da UE que estabelece a lista de alegações nutricionais e de saúde inclui a seguinte alegação: *“Substituir os amidos digestíveis por **amido resistente** numa refeição contribui para um menor aumento da glicose no sangue após essa mesma refeição”*. As condições de utilização da alegação referem: *“A alegação só pode ser utilizada para alimentos nos quais o amido digestível tenha sido substituído por **amido resistente** de modo a que o teor final de **amido resistente** seja, pelo menos, 14% do amido total”*. Os resultados do nosso estudo e de outros, nomeadamente Hallstrom *et al.* (44) e Klosterbuer *et al.* (81), sugerem que o AR apresenta efeitos benéficos mesmo quando o teor de amido disponível não sofre alteração, ou seja, a presença de AR influencia a digestibilidade do amido disponível. Em particular no nosso estudo, foram observados efeitos positivos com um teor de AR de cerca de 5% do amido total. Seria desejável que este tema fosse mais estudado no sentido de avaliar o efeito do AR na digestibilidade da fração de amido disponível e, eventualmente propor uma alegação de saúde que exprima este benefício fisiológico.

O doseamento do AR não é um parâmetro que seja efetuado por rotina na análise de alimentos. É prática comum realizar o doseamento da fibra mas, de uma forma geral, o método que se usa não inclui a fração de AR presente no alimento. No caso de alimentos especialmente ricos em AR, o doseamento da fibra pelos métodos convencionais não inclui este componente, pelo que o teor de fibra total fica subvalorizado. Face aos benefícios apresentados pelo AR, seria importante que em alimentos em que este componente se encontre em teores consideráveis, fosse referido na respetiva rotulagem o teor em AR.

Por outro lado o IG do alimento reflete a fração de AR presente. No caso de alimentos com teor de AR significativo, o IG exprime melhor a qualidade dos HC do alimento do que a indicação da categoria dos HC presentes e/ou o teor de fibra alimentar.

O presente trabalho estudou o efeito do AR na resposta glicémica, insulínica e na saciedade no entanto são descritos outros benefícios importantes deste componente, nomeadamente na patologia intestinal o que contribui para aumentar o interesse nutricional deste composto.



Será também importante efetuar estudos durante períodos de tempo mais longos e em indivíduos com resposta glicêmica deficiente. Alguns estudos em roedores sugerem diversos efeitos benéficos resultantes da ingestão continuada de AR, no entanto os estudos efetuados em seres humanos não são suficientemente longos para que seja possível confirmar ou declinar estes benefícios.

O AR revela-se uma substância com elevado interesse nutricional devido aos efeitos fisiológicos benéficos que apresenta. O reforço da dieta com AR pode contribuir para uma alimentação saudável e equilibrada promotora de saúde, prevenindo o risco de algumas doenças muito prevalentes na sociedade atual.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Disease - Technical Report Series 916. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: World Health Organization; 2003.
2. Popkin BM. Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;84(2):289-98.
3. Figueira ME. Nutracêuticos na fronteira com os alimentos funcionais. In: Pinto JF, editor. *Nutracêuticos e Alimentos Funcionais*. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, Lda; 2010. p. 276.
4. Hawkes C, Buse K. Public health sector and food industry interaction: it's time to clarify the term 'partnership' and be honest about underlying interests. *European Journal of Public Health*. 2011;21(4):400-1.
5. WHO. 2008-2013 Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases. Geneva: World Health Organization; 2008.
6. WHO. Obesity and Overweight - Fact Sheet 311. Geneva: World Health Organization; 2015.
7. Westenbrink S, Brunt K, van der Kamp J-W. Dietary fibre: Challenges in production and use of food composition data. *Food Chemistry*. 2013;140(3):562-7.
8. Cummings JH, Roberfroid MB, Andersson H, Barth C, FerroLuzzi A, Ghos Y, et al. A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1997;51(7):417-23.
9. Cummings JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2007;61:S5-S18.
10. Englyst KN, Liu S, Englyst HN. Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2007;61:S19-S39.
11. Mann J, Cummings JH, Englyst HN, Key T, Liu S, Riccardi G, et al. FAO/WHO Scientific Update on carbohydrates in human nutrition: conclusions. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2007;61:S132-S7.
12. Englyst KN, Englyst HN. Carbohydrate bioavailability. *British Journal of Nutrition*. 2005;94(1):1-11.
13. Commission Codex Alimentarius. Report on the 30th session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses. ALINORM 09/32/26. Rome 2009. Appendix II. p.46.
14. European Commission. Commission Directive 2008/100/EC of 28 October 2008 amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for foodstuffs as regards recommended

- daily allowances, energy conversion factors and definitions. Official Journal of the European Union; 2008.
15. Belitz H-D, Grosh W, Schieberle P. Food Chemistry. 4th revised and extended ed. ed. Berlin: Springer-Verlag; 2009. p. 315-318.
  16. Englyst H, Wiggins HS, Cummings JH. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid-chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*. 1982;107(1272):307-18.
  17. Englyst HN, Cummings JH. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small-intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1985;42(5):778-87.
  18. Englyst HN, Trowell H, Southgate DAT, Cummings JH. Dietary fiber and resistant starch. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1987;46(6):873-4.
  19. Asp NG, Bjorck I, Holm J, Nyman M, Siljestrom M. Enzyme resistant starch fractions and dietary fiber. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1987;22:29-32.
  20. Escarpa A, Gonzalez MC, Morales MD, SauraCalixto F. An approach to the influence of nutrients and other food constituents on resistant starch formation. *Food Chemistry*. 1997;60(4):527-32.
  21. Lobo AR, Lemos Silva GM. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. *Revista de Nutrição*. 2003;16(2):219-26.
  22. Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. Resistant starch - a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2006;5(1):1-17.
  23. Englyst HN, Kingman SM, Hudson GJ, Cummings JH. Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. *British Journal of Nutrition*. 1996;75(5):749-55.
  24. Rochfort S, Panozzo J. Phytochemicals for health, the role of pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(20):7981-94.
  25. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota - introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 1995;125(6):1401-12.
  26. Sharma A, Yadav BS, Ritika. Resistant starch: physiological roles and food applications. *Food Reviews International*. 2008;24(2):193-234.
  27. Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1992;46:S33-S50.
  28. Champ M, Langkilde AM, Brouns F, Kettlitz B, Le Bail-Collet Y. Advances in dietary fibre characterisation. 2. Consumption, chemistry, physiology and measurement of resistant starch; implications for health and food labelling. *Nutrition Research Reviews*. 2003;16(2):143-61.

29. Higgins JA, Brown IL. Resistant starch: a promising dietary agent for the prevention/treatment of inflammatory bowel disease and bowel cancer. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2013;29(2):190-4.
30. Haralampu SG. Resistant starch - a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydrate Polymers*. 2000;41(3):285-92.
31. Nugent AP. Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*. 2005;30(1):27-54.
32. Fuentes-Zaragoza E, Riquelme-Navarrete MJ, Sanchez-Zapata E, Perez-Alvarez JA. Resistant starch as functional ingredient: a review. *Food Research International*. 2010;43(4):931-42.
33. Lunn J, Buttriss JL. Carbohydrates and dietary fibre. *Nutrition Bulletin*. 2007;32(1):21-64.
34. Comissão Europeia. Decisão de execução da comissão de 5 de Agosto de 2011 relativa à autorização de colocação no mercado de amido de milho fosfatado como novo ingrediente alimentar, nos termos do Regulamento (CE) n. 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho 2011/494/EU. *Jornal Oficial da União Europeia*; 2011.
35. Frohberg C, Quanz M, inventors; Bayer Cropscience Gmbh. Use of water-insoluble linear poly-alpha-1,4-D-glucans as resistant starch in foodstuff industry patent WO2005040223-A; WO2005040223-A1; EP1682585-A1; JP2007508832-W; US2008249297-A1; EP1682585-B1; DE602004023750-E; ES2333434-T3.
36. Homayouni A, Amini A, Keshtiban AK, Mortazavian AM, Esazadeh K, Pourmoradian S. Resistant starch in food industry: a changing outlook for consumer and producer. *Starch-Starke*. 2014;66(1-2):102-14.
37. Fuentes-Zaragoza E, Sanchez-Zapata E, Sendra E, Sayas E, Navarro C, Fernandez-Lopez J, et al. Resistant starch as prebiotic: a review. *Starch-Starke*. 2011;63(7):406-15.
38. Liljeberg Elmstahl H. Resistant starch content in a selection of starchy foods on the Swedish market. *European journal of clinical nutrition*. 2002;56(6):500-5.
39. Sandhu KS, Lim S-T. Structural characteristics and in vitro digestibility of mango kernel starches (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*. 2008;107(1):92-7.
40. Eerlingen RC, Vanhaesendonck IP, Depaepe G, Delcour JA. Enzyme-resistant starch 3. The quality of straight-dough bread containing varying levels of enzyme-resistant starch. *Cereal Chemistry*. 1994;71(2):165-70.
41. Granfeldt Y, Drews A, Bjorck I. Arepas made from high amylose corn flour produce favorably low glucose and insulin responses in healthy humans. *Journal of Nutrition*. 1995;125(3):459-65.
42. Niba LL. Effect of storage period and temperature on resistant starch and beta-glucan content in cornbread. *Food Chemistry*. 2003;83(4):493-8.

43. Akerberg A, Liljeberg H, Bjorck I. Effects of amylose/amylopectin ratio and baking conditions on resistant starch formation and glycaemic indices. *Journal of Cereal Science*. 1998;28(1):71-80.
44. Hallstrom E, Sestili F, Lafiandra D, Bjorck I, Ostman E. A novel wheat variety with elevated content of amylose increases resistant starch formation and may beneficially influence glycaemia in healthy subjects. *Food & Nutrition Research*. 2011;55:7074.
45. Abdel-Aal E-SM, Rabalski M. Effect of baking on nutritional properties of starch in organic spelt whole grain products. *Food Chemistry*. 2008;111(1):150-6.
46. Angioloni A, Collar C. Nutritional and functional added value of oat, Kamut<sup>®</sup>, spelt, rye and buckwheat versus common wheat in breadmaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011;91(7):1283-92.
47. Collar C, Jimenez T, Conte P, Fadda C. Impact of ancient cereals, pseudocereals and legumes on starch hydrolysis and antiradical activity of technologically viable blended breads. *Carbohydrate polymers*. 2014;113:149-58.
48. Mario Sanz-Penella J, Wronkowska M, Soral-Smietana M, Collar C, Haros M. Impact of the addition of resistant starch from modified pea starch on dough and bread performance. *European Food Research and Technology*. 2010;231(4):499-508.
49. Pacheco-Delahaye E, Testa G. Nutritional, physical and sensorial evaluation of wheat breads and green bananas. *Interciencia*. 2005;30(5):300-4.
50. Juarez-Garcia E, Agama-Acevedo E, Sayago-Ayerdi SG, Rodriguez-Ambriz SL, Bello-Perez LA. Composition, digestibility and application in breadmaking of banana flour. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2006;61(3):131-7.
51. Ovando-Martinez M, Sayago-Ayerdi S, Agama-Acevedo E, Goni I, Bello-Perez LA. Unripe banana flour as an ingredient to increase the undigestible carbohydrates of pasta. *Food Chemistry*. 2009;113(1):121-6.
52. Rodriguez-Ambriz SL, Islas-Hernandez JJ, Agama-Acevedo E, Tovar J, Bello-Perez LA. Characterization of a fibre-rich powder prepared by liquefaction of unripe banana flour. *Food Chemistry*. 2008;107(4):1515-21.
53. Ashwar BA, Gani A, Shah A, Wani IA, Masoodi FA. Preparation, health benefits and applications of resistant starch —a review. *Starch*. 2015;67:1-15.
54. Raigond P, Ezekiel R, Raigond B. Resistant starch in food: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015;95:1968-78.

55. Garcia-Alonso A, Jimenez-Escrig A, Martin-Carron N, Bravo L, Saura-Calixto F. Assessment of some parameters involved in the gelatinization and retrogradation of starch. *Food Chemistry*. 1999;66(2):181-7.
56. Skrabanja V, Kreft I. Resistant starch formation following autoclaving of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. An in vitro study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;46(5):2020-3.
57. Eerlingen RC, Delcour JA. Formation, analysis, structure and properties of type-III enzyme resistant starch. *Journal of Cereal Science*. 1995;22(2):129-38.
58. Perera A, Meda V, Tyler RT. Resistant starch A review of analytical protocols for determining resistant starch and of factors affecting the resistant starch content of foods. *Food Research International*. 2010;43(8):1959-74.
59. Johansson CG, Siljestrom M, Asp NG. Dietary fiber in bread and corresponding flours - formation of resistant starch during baking. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*. 1984;179(1):24-8.
60. Siljestrom M, Asp NG. Resistant starch formation during baking - effect of baking time and temperature and variations in the recipe. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*. 1985;181(1):4-8.
61. Berry CS. Resistant starch - formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fiber. *Journal of Cereal Science*. 1986;4(4):301-14.
62. Yadav BS. Effect of frying, baking and storage conditions on resistant starch content of foods. *British Food Journal*. 2011;113(6-7):710-9.
63. Carreira MC, Lajolo FM, de Menezes EW. Glycemic index: Effect of food storage under low temperature. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2004;47(4):569-74.
64. Higgins JA. Resistant starch: metabolic effects and potential health benefits. *J AOAC Int*. 2004;87(3):761-8.
65. Moreau NM, Martin LJ, Toquet CS, Laboisie CL, Nguyen PG, Siliart BS, et al. Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *British Journal of Nutrition*. 2003;90(1):75-85.
66. Muir JG, Yeow EGW, Keogh J, Pizzey C, Bird AR, Sharpe K, et al. Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;79(6):1020-8.

67. Elena Rodriguez-Cabezas M, Camuesco D, Arribas B, Garrido-Mesa N, Comalada M, Bailon E, et al. The combination of fructooligosaccharides and resistant starch shows prebiotic additive effects in rats. *Clinical Nutrition*. 2010;29(6):832-9.
68. Hamer HM, Jonkers DMAE, Bast A, Vanhoutvin SALW, Fischer MAJG, Kodde A, et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clinical Nutrition*. 2009;28(1):88-93.
69. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*. 2003;361(9368):1496-501.
70. Cassidy A, Bingham SA, Cummings JH. Starch intake and colorectal-cancer risk - an international comparison. *British Journal of Cancer*. 1994;69(5):937-42.
71. Hylla S, Gostner A, Dusel G, Anger H, Bartram HP, Christl SU, et al. Effects of resistant starch on the colon in healthy volunteers: Possible implications for cancer prevention. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1998;67(1):136-42.
72. Grubben M, Van den Braak CCM, Essenberg M, Olthof M, Tangerman A, Katan MB, et al. Effect of resistant starch on potential biomarkers for colonic cancer risk in patients with colonic adenomas - a controlled trial. *Digestive Diseases and Sciences*. 2001;46(4):750-6.
73. Young GP, Le Leu RK. Resistant starch and colorectal neoplasia. *Journal of AOAC Int*. 2004;87(3):775-86.
74. Cruz-Bravo RK, Guevara-Gonzalez R, Ramos-Gomez M, Garcia-Gasca T, Campos-Vega R, Oomah BD, et al. Fermented nondigestible fraction from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar negro 8025 modulates HT-29 cell behavior. *Journal of Food Science*. 2011;76(2):T41-T7.
75. Fassler C, Gill CIR, Arrigoni E, Rowland I, Amado R. Fermentation of resistant starches: influence of in vitro models on colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer-an International Journal*. 2007;58(1):85-92.
76. O'Callaghan NJ, Toden S, Bird AR, Topping DL, Fenech M, Conlon MA. Colonocyte telomere shortening is greater with dietary red meat than white meat and is attenuated by resistant starch. *Clinical Nutrition*. 2012;31(1):60-4.
77. Fung KYC, Cosgrove L, Lockett T, Head R, Topping DL. A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *British Journal of Nutrition*. 2012;108(5):820-31.
78. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to resistant starch and reduction of post-prandial



- glycaemic responses (ID 681), “digestive health benefits” (ID 682) and “favours a normal colon metabolism” (ID 783) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2011;9(4):2024. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal>
79. Comissão Europeia. Regulamento (UE) Nº 432/2012 da Comissão de 16 de maio de 2012 que estabelece uma lista de alegações de saúde permitidas relativas a alimentos que não referem a redução de um risco de doença ou o desenvolvimento e a saúde das crianças. Jornal Oficial da União Europeia; 2012.
  80. Bodinham CL, Frost GS, Robertson MD. Acute ingestion of resistant starch reduces food intake in healthy adults. *British Journal of Nutrition*. 2010;103(6):917-22.
  81. Klosterbuer AS, Thomas W, Slavin JL. Resistant starch and pullulan reduce postprandial glucose, insulin, and GLP-1, but have no effect on satiety in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(48):11928-34.
  82. Haub MD, Hubach KL, Al-Tamimi EK, Ornelas S, Seib PA. Different types of resistant starch elicit different glucose responses in humans. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2010;art.ID230501.
  83. Robertson MD. Dietary-resistant starch and glucose metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2012;15(4):362-7.
  84. Robertson MD, Bickerton AS, Dennis AL, Vidal H, Frayn KN. Insulin-sensitizing effects of dietary resistant starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;82(3):559-67.
  85. Johnston KL, Thomas EL, Bell JD, Frost GS, Robertson MD. Resistant starch improves insulin sensitivity in metabolic syndrome. *Diabetic Medicine*. 2010;27(4):391-7.
  86. Maki KC, Pelkman CL, Finocchiaro ET, Kelley KM, Lawless AL, Schild AL, et al. Resistant starch from high-amylose maize increases insulin sensitivity in overweight and obese men. *Journal of Nutrition*. 2012;142(4):717-23.
  87. Bodinham CL, Smith L, Thomas EL, Bell JD, Swann JR, Costabile A, et al. Efficacy of increased resistant starch consumption in human type 2 diabetes. *Endocrine connections*. 2014;3(2):75-84.
  88. Jenkins DJA, Vuksan V, Kendall CWC, Wursch P, Jeffcoat R, Waring S, et al. Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. *Journal of the American College of Nutrition*. 1998;17(6):609-16.
  89. Noakes M, Clifton PM, Nestel PJ, LeLeu R, McIntosh G. Effect of high-amylose starch and oat bran on metabolic variables and bowel function in subjects with hypertriglyceridemia. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1996;64(6):944-51.

90. Nichenametla SN, Weidauer LA, Wey HE, Beare TM, Specker BL, Dey M. Resistant starch type 4-enriched diet lowered blood cholesterol and improved body composition in a double blind controlled cross-over intervention. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2014;58(6):1365-9.
91. Birt DF, Boylston T, Hendrich S, Jane J-L, Hollis J, Li L, et al. Resistant starch: promise for improving human health. *Advances in Nutrition*. 2013;4(6):587-601.
92. Slavin JL. Dietary fiber and body weight. *Nutrition*. 2005;21(3):411-8.
93. Kendall CWC, Esfahani A, Jenkins DJA. The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids*. 2010;24(1):42-8.
94. Higgins JA. Resistant starch and energy balance: impact on weight loss and maintenance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014;54(9):1158-66.
95. Higgins JA, Jackman MR, Brown IL, Johnson GC, Steig A, Wyatt HR, et al. Resistant starch and exercise independently attenuate weight regain on a high fat diet in a rat model of obesity. *Nutrition & Metabolism*. 2011;8:49.
96. Tapsell LC. Diet and metabolic syndrome: Where does resistant starch fit in? *Journal of AOAC International*. 2004;87(3):756-60.
97. Higgins JA, Higbee DR, Donahoo WT, Brown IL, Bell ML, Bessesen DH. Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. *Nutrition & Metabolism*. 2004;1:8-11.
98. Verdich C, Flint A, Gutzwiller JP, Naslund E, Beglinger C, Hellstrom PM, et al. A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(9):4382-9.
99. Pimentel GD, Zemdegs JCS. Foods and nutrients modulates the release of anorexigenic gastrointestinal hormones. *Acta Médica Portuguesa*. 2010;23:891-900.
100. Luhovyy BL, Mollard RC, Yurchenko S, Nunez MF, Berengut S, Liu TT, et al. The effects of whole grain high-amylose maize flour as a source of resistant starch on blood glucose, satiety, and food intake in young men. *Journal of Food Science*. 2014;79(12):H2550-H6.
101. Flint A, Raben A, Blundell JE, Astrup A. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *International Journal of Obesity*. 2000;24(1):38-48.
102. Willis HJ, Eldridge AL, Beiselgel J, Thomas W, Slavin JL. Greater satiety response with resistant starch and corn bran in human subjects. *Nutrition Research*. 2009;29(2):100-5.
103. McCleary BV. Measurement of resistant starch and incorporation of resistant starch into dietary measurements. In: Shi Y-C, Clodualdo C., editor. *Resistant starch: sources, applications and health benefits*. John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 131-44.

104. Wolever TMS. Is glycaemic index (GI) a valid measure of carbohydrate quality? *European Journal of Clinical Nutrition*. 2013;67:522-31.
105. Jenkins DJA, Wolever TMS, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, et al. Glycemic index of foods - A physiological-basis for carbohydrate exchange. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1981;34(3):362-6.
106. Brouns F, Bjorck I, Frayn KN, Gibbs AL, Lang V, Slama G, et al. Glycaemic index methodology. *Nutrition Research Reviews*. 2005;18(1):145-71.
107. Wolever TMS, Brand-Miller JC, Abernethy J, Astrup A, Atkinson F, Axelsen M, et al. Measuring the glycemic index of foods: interlaboratory study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008;87(1):247S-57S.
108. FAO/WHO. Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. FAO Food and nutrition paper. 1998;66:1-140.
109. Liu SM, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB, Franz M, Sampson L, et al. A prospective study of dietary glycemic load, carbohydrate intake, and risk of coronary heart disease in US women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000;71(6):1455-61.
110. Platel K, Shurpalekar KS. Resistant starch content of indian foods. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1994;45(1):91-5.
111. Muir JG, Walker KZ, Kaimakamis MA, Cameron MA, Govers M, Lu ZX, et al. Modulation of fecal markers relevant to colon cancer risk: a high-starch Chinese diet did not generate expected beneficial changes relative to a western-type diet. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1998;68(2):372-9.
112. Brighenti F, Casiraghi MC, Baggio C. Resistant starch in the Italian diet. *British Journal of Nutrition*. 1998;80(4):333-41.
113. Tomlin J, Read NW. The effect of resistant starch on colon function in humans. *British Journal of Nutrition*. 1990;64(2):589-95.
114. Liljeberg HGM, Lonner CH, Bjorck IME. Sourdough fermentation or addition of organic-acids or corresponding salts to bread improves nutritional properties of starch in healthy humans. *Journal of Nutrition*. 1995;125(6):1503-11.
115. Liljeberg H, Akerberg A, Bjorck I. Resistant starch formation in bread as influenced by choice of ingredients or baking conditions. *Food Chemistry*. 1996;56(4):389-94.
116. Gelencser T, Gal V, Hodsagi M, Salgo A. Evaluation of quality and digestibility characteristics of resistant starch-enriched pasta. *Food and Bioprocess Technology*. 2008;1(2):171-9.

117. Aravind N, Sissons M, Fellows CM, Blazek J, Gilbert EP. Optimisation of resistant starch II and III levels in durum wheat pasta to reduce in vitro digestibility while maintaining processing and sensory characteristics. *Food Chemistry*. 2013;136(2):1100-9.
118. Topping DL, Fukushima M, Bird AR. Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2003;62(1):171-6.
119. Rokka S, Rantamaki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*. 2010;231(1):1-12.
120. Ziar H, Gerard P, Riaz A. Calcium alginate-resistant starch mixed gel improved the survival of *Bifidobacterium animalis subsp lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012;47(7):1421-9.
121. Lopes C, Oliveira A, Santos AC, Ramos E, Gaio AR, Severo M, Barros H. Consumo alimentar no Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2006. Disponível em: [www.consumoalimentarporto.med.up.pt](http://www.consumoalimentarporto.med.up.pt)
122. Instituto Nacional de Estatística, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Inquérito Nacional de Saúde 2005/2006: Instituto Nacional de Estatística, IP; 2009. Disponível em: [www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Paginas/INS2005-2006.aspx](http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Paginas/INS2005-2006.aspx).
123. Murphy MM, Douglass JS, Birkett A. Resistant starch intakes in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*. 2008;108(1):67-78.
124. Cauvain SP, Young LS. *Technology of Breadmaking*. Second Edition ed: Springer; 2007. p. 21-47.
125. AACC International. Method 44-15.02. Moisture—Air-Oven Methods. Approved November 3, 1999. Approved methods of analysis. 11 th ed. St. Paul, MN, U.S.A.: AACC International.
126. AACC International. Method 32-40.01. Resistant starch in starch samples and plant materials. Approved October 17, 2002. Approved methods of analysis. 11 th ed. St. Paul, MN, U.S.A.: AACC International.
127. McCleary BV, McNally M, Rossiter P, Aman P, Amrein T, Arnouts S, et al. Measurement of resistant starch by enzymatic digestion in starch and selected plant materials: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 2002;85(5):1103-11.
128. FAO. Food energy - methods of analysis and conversion factors. Food and Nutrition Paper 77. Rome; 2003.
129. WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic - Technical Report Series 894. Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization; 2000.

130. Marôco J. Análise estatística com o SPSS statistics. 5ª edição. Pero Pinheiro: Ed. Report Number; 2011. p. 44-46
131. Eerlingen RC, Crombez M, Delcour JA. Enzyme-resistant starch .1. Quantitative and qualitative influence of incubation-time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation. Cereal Chemistry. 1993;70(3):339-44.
132. Atkinson FS, Foster-Powell K, Brand-Miller JC. International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008. Diabetes Care. 2008;31(12):2281-3.
133. WorldHealthOrganization. Food based dietary guidelines in the WHO European Region. WHO; 2003.



No âmbito da investigação associada a este trabalho foram realizadas as seguintes comunicações/publicações:

Artigos em revistas internacionais indexadas (Anexo 1):

Amaral, O., Guerreiro, C. S., Gomes, A., & Cravo, M. (2016). Resistant starch production in wheat bread: effect of ingredients, baking conditions and storage. *European Food Research and Technology*, 1-7. doi:10.1007/s00217-016-2674-4

Publicação em revista internacional indexada:

Amaral, O., Sousa Guerreiro, C., Almeida, A., & Cravo, M. (2015). SUN-LB028: Effect of Bread Containing High Level of Resistant Starch on Glucose and Insulin Responses. *Clinical Nutrition*, 34, S245. doi:10.1016/S0261-5614(15)30749-4

Abstracts of the 37th ESPEN Congress Lisbon, Portugal, 5 – 8 September 2015

Comunicações em encontros técnico científicos publicadas em ata

Amaral, O., Guerreiro, C. S., e Cravo, M. (2015). Efeito da ingestão de pão com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica e insulínica. In 2º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge: livro de resumos, Lisboa, 26 novembro (p. 51).

Publicação em revista técnica:

Amaral, O. (2015). Amido Resistente. Propriedades fisiológicas e aplicações. *Tecno Alimentar* (4), 75-79.

Pedido de Patente de Invenção Nacional registada com o nº 20161000021169, código 0199 com o título “Método de produção de pão com elevado teor em amido resistente”.

Artigos submetidos a revistas internacionais indexadas:

Amaral, O., Guerreiro, C. S., Almeida, A., & Cravo, M. Effect of bread containing high level of resistant starch on glucose and insulin responses. *European Journal of Nutrition*.

Amaral, O., Guerreiro, C. S. & Cravo, M. The acute effects of bread containing high level of resistant starch on satiety in healthy individuals. *Plant Foods for Human Nutrition*.

Comunicações orais em encontros técnicos-científicos:

Comunicação oral, a convite do Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL), com o título “Pão com elevado teor em amido resistente” no Workshop Inovação e Qualidade na Transformação de Produtos Agroalimentares, realizado no dia 18 de março de 2015 em Beja. Organização de: Alentejo XXI – Associação de Desenvolvimento Integrado do Meio Rural.

Comunicação oral com o título “Desenvolvimento de pão com elevado teor em amido resistente” no 1º Simpósio Produção e Transformação Industrial de Alimentos, realizado no dia 3 de junho de 2015 em Caparica. Organização de: CENIMAT Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Comunicação oral, a convite da Associação Terras Dentro, com o título “Pão com elevado teor em amido resistente” no Colóquio Pão e Doçaria Alentejana, realizado no dia 1 de Junho de 2015 em Lisboa. Organização de: Terras Dentro – Associação para o Desenvolvimento Integrado e co-financiado pelo Inalentejo.

No âmbito do tema desta tese estão a ser desenvolvidos trabalhos conjuntos com uma empresa da indústria panificadora da área da Grande Lisboa com o objetivo de colocar no mercado um produto de panificação enriquecido em amido resistente.



## **AGRADECIMENTOS**

O caminho faz-se caminhando e faz-se melhor quando caminhamos acompanhados. Este é o momento de agradecer a quem esteve ao meu lado nesta jornada.

Em primeiro lugar quero agradecer às minhas orientadoras:

- à Prof. Doutora Catarina Sousa Guerreiro pela disponibilidade e apoio que sempre demonstrou, pela capacidade crítica e rigor e especialmente por ter aceite a orientação deste trabalho;
- à Prof. Doutora Marília Cravo pelo apoio e ajuda sempre presentes, pelos desafios colocados ao longo do trabalho e pelas palavras sempre positivas e animadoras.

Um bem-haja muito sincero a ambas.

Quando pensei trabalhar neste tema, sem quaisquer trabalhos prévios realizados pela comunidade científica em Portugal, foi um risco que assumi e um desafio que abracei. Ainda hesitante, foi a Prof. Doutora Isabel do Carmo que me ouviu, apoiou e incentivou. Bem-haja por ter acreditado em mim e no tema de investigação.

Um agradecimento muito especial à Prof. Doutora Ana Gomes da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto pela disponibilidade e apoio na revisão crítica da primeira fase do trabalho.

Agradeço ao Instituto Politécnico de Beja ter-me proporcionado as condições indispensáveis à realização do trabalho experimental nomeadamente instalações, equipamentos e consumíveis vários. Aos colegas do IPBeja, Prof. Doutor Pedro Oliveira e Silva e Prof. Luis Domingues agradeço o apoio no tratamento estatístico dos dados e às Prof. Antonieta Medeiros e Prof. Miquelina Pena a ajuda nas colheitas de sangue. Aos colaboradores do Laboratório de Apoio à Atividade Física e Saúde e do Centro de Ciência e Tecnologia dos Alimentos o meu bem-haja por toda a ajuda.

Ao Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL) agradeço a disponibilidade de equipamento para a realização das técnicas analíticas.

Agradeço ao Hospital José Joaquim Fernandes da Unidade Local de Saúde do Baixo Alentejo, nomeadamente à Dra. Isabel Ramôa do Serviço de Diabetes o apoio no ensaio clínico nomeadamente na disponibilização de equipamento e material descartável para medição da glicémia capilar e no doseamento da hemoglobina A1c a todos os voluntários

do estudo e à Dra. Graça Cristina do Serviço de Patologia Clínica o apoio no tratamento das amostras de sangue para posterior doseamento da insulina.

Agradeço à Prof. Ana Almeida a realização do doseamento da insulina nas amostras de soro dos voluntários e à Prof. Elizabete Carolino a troca de ideias sobre o tratamento estatístico dos dados, ambas da Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Instituto Politécnico de Lisboa.

Aos 37 voluntários do ensaio clínico, muitos deles amigos que me acompanharam durante todo o trabalho com palavras de incentivo e estímulo, bem hajam por tudo: o vosso tempo, a preocupação em seguir as orientações do ensaio, a tolerância pelos dedos doridos.

Agradeço aos amigos Sofia, João, Rita, Filipe, António, Teresa, Isabel e Fátima pela motivação, ânimo, apoio e pelas gargalhadas que me arrancaram. À minha irmã Anabela, bem-haja pela paciente ajuda na revisão do inglês.

Cada um à sua maneira, os meus filhos Ana Rita, Francisco e Guilherme, foram o motor e a motivação para a concretização deste projeto. A tranquilidade que me transmitiram nos momentos em que estive menos presente foi essencial para a dedicação a este trabalho.

Uma palavra final ao João que caminha ao meu lado há mais de 30 anos. Neste percurso foram fundamentais a empatia, a paciência, o apoio, as palavras de ânimo e especialmente o humor e o amor.

A todos, bem hajam!

## APÊNDICE 1

### CONVITE PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO ENVIADO POR *E-MAIL* E RESPECTIVO ANEXO

Caro(a) colega

No âmbito do meu trabalho de doutoramento necessito de efetuar um ensaio nutricional com a participação de cerca de 40 voluntários. O estudo consiste em testar uma nova fórmula de pão com elevado teor em amido resistente comparativamente ao pão tradicional. Em anexo encontra um documento que descreve a metodologia e também o que é solicitado a quem se disponibilize como voluntário. No mesmo documento estão elencados um conjunto de requisitos que os voluntários deverão reunir.

Se reúne os requisitos e está disponível para participar no estudo nutricional, envie-me um e-mail com nome e contacto. Se necessitar de mais informações sobre este ensaio poderá contactar-me por e-mail, através do telemóvel 966823792 ou da extensão 01077 (Gab 18) da ESA-IPBeja.

Desde já, agradeço a atenção dada a este *e-mail*. Teria muito gosto que fosse um dos voluntários do meu estudo.

Com os melhores cumprimentos

Olga Amaral

Professora Adjunta

Instituto Politécnico de Beja

ANEXO AO E-MAIL

**Título do estudo:** Efeito da ingestão de pão de trigo com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica.

Os objetivos deste estudo são:

- Determinar o efeito da ingestão de pão de trigo com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica e na saciedade de indivíduos não diabéticos comparativamente ao pão tradicional
- Determinar o Índice Glicémico do pão de trigo com elevado teor em amido resistente.

O amido resistente é uma das frações do amido presentes naturalmente no pão tradicional e que apresenta numerosas vantagens fisiológicas, nomeadamente efeitos protetores para doenças do trato gastrointestinal, cardiovascular, dislipidemias, diabetes e obesidade. Esta fração do amido está normalmente presente em concentrações muito baixas. Previamente a este estudo foram testadas diferentes fórmulas e tecnologias de fabrico de forma a otimizar o teor de amido resistente no pão, obtendo-se um pão com elevado teor em amido resistente.

Para que possa participar neste estudo deverá preencher os seguintes **requisitos**:

- Idade compreendida entre **18 e 65 anos**;
- **Peso estável** nos últimos 3 meses;
- **Não** ter diagnóstico médico de **diabetes ou outras doenças endócrinas**;
- **Não** ter história clínica de **doença gastrointestinal ou distúrbios endócrinos**;
- **Não** estar a tomar **medicamentos que interfiram com o metabolismo glicídico ou lipídico**;
- **Não** ter estado **internado** nos últimos 3 meses;
- **Não** estar **grávida ou a amamentar**;
- **Não** ser **fumador**;
- **Não** ser **vegetariano**;

- Efetuar regularmente a refeição do **pequeno-almoço**.

Caso preencha os requisitos definidos é um candidato a participar neste estudo. A sua participação é voluntária e poderá abandoná-lo a qualquer momento.

Como participante no estudo ser-lhe-á pedido que seja avaliado o seu peso e a sua altura, numa sessão breve a combinar de acordo com as suas disponibilidades. Consoante esta avaliação será pedido que colabore em **duas sessões** (se apresenta IMC > 24,9) ou **quatro sessões** (se apresenta IMC entre 18,5 e 24,9). Cada sessão tem a duração aproximada de **2 horas**, decorrerão logo de manhã, ainda em **jejum** e deverão ser intervaladas em pelo menos uma semana. As datas e os dias serão encontrados de acordo com as disponibilidades dos voluntários.

As duas sessões comuns a todos os participantes constam de uma refeição teste (pequeno-almoço após o jejum noturno) constituída por uma **dose de pão e 250 ml de água**. Antes da refeição teste ser-lhe-á pedido que preencha uma **escala visual analógica de avaliação da sensação de apetite** e serão recolhidas **duas amostras de sangue capilar por picada no dedo**. O procedimento de preenchimento da escala visual e de recolha de amostras de sangue capilar é **repetido aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min**. Em todas as amostras de sangue é determinada a **glicémia**.

Se o seu IMC se situa entre 18,5 e 24,9 deverá ainda participar em mais duas sessões, semelhantes às anteriores, sendo que a dose de pão e água é substituída por uma solução de **50g de glicose em 250 ml em água**. Estas duas sessões são exatamente iguais entre si.

**Os dados pessoais dos participantes não serão nunca revelados** sendo o seu registo efetuado sob a forma de um código que lhe será atribuído. Os investigadores que têm acesso aos seus dados pessoais estão sujeitos a sigilo profissional. Caso pretenda, os seus dados ser-lhe-ão disponibilizados no final de cada sessão. Não haverá qualquer custo ou pagamento inerentes à participação neste estudo.

Este trabalho insere-se no meu trabalho de investigação no âmbito do Doutoramento em Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e foi aprovado pelo IPBeja e pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Lisboa Norte. Antes de participar no estudo deverá assinar o Termo de Consentimento Informado aprovado pela referida Comissão de Ética.

Agradeço desde já a atenção dada a este documento.

Olga Amaral (Investigador responsável pelo estudo)

olga.amaral@ipbeja.pt

Dep. Tecnologias e Ciências Aplicadas - IPBeja

## APENDICE 2

### Ficha individual

NOME:	
CONTACTOS:	E-MAIL:
	TELEFONE:
DATA DE NASCIMENTO:	
PESO:	
ALTURA:	
IMC:	
GRUPO:	CÓDIGO:
HbA1c:	
DISPONIBILIDADE PARA AS SESSÕES	3ª f
	5ª f
	sábado

#### Requisitos:

Idade compreendida entre 18 e 65 anos	
Índice de massa corporal igual ou superior a $18,5\text{Kg m}^{-2}$	
Peso estável nos últimos 3 meses	
Não ter diagnóstico médico de diabetes ou outras doenças endócrinas	
Não ter história clínica de doença gastrointestinal ou distúrbios endócrinos	
Não estar a tomar medicamentos que interfiram com o metabolismo glicídico ou lipídico	
Não ter estado internado nos últimos 3 meses	
Não estar grávida ou a amamentar	
Não ser fumador	
Não ser vegetariano	
Efetuar regularmente a refeição do pequeno-almoço	

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Olga Amaral

Investigador responsável pelo estudo

## **APÊNDICE 3**

### **FOLHA DE INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE**

**Título do estudo:** Efeito da ingestão de pão de trigo com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica.

Apresentou-se como voluntário(a) a participar neste estudo. Para que possa tomar uma decisão consciente, este documento descreve os objetivos do estudo e os diferentes procedimentos.

Os objetivos deste estudo são determinar o efeito da ingestão de pão de trigo com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica e na saciedade de indivíduos não diabéticos comparativamente ao pão tradicional. Este trabalho também tem como finalidade determinar o Índice glicémico do pão de trigo com elevado teor em amido resistente.

O amido resistente é uma das frações do amido presentes naturalmente no pão tradicional e que apresenta numerosas vantagens fisiológicas, nomeadamente efeitos protetores para doenças do trato gastrointestinal, cardiovascular, dislipidemias, diabetes e obesidade. Esta fração do amido está normalmente presente em concentrações muito baixas. Previamente a este estudo foram testadas diferentes fórmulas e tecnologias de fabrico de forma a otimizar o teor de amido resistente no pão, obtendo-se um pão com elevado teor em amido resistente.

Para que possa participar neste estudo deverá preencher os seguintes requisitos:

- Idade compreendida entre 18 e 65 anos;
- Índice de massa corporal igual ou superior a  $18,5\text{Kg m}^{-2}$ ;
- Peso estável nos últimos 3 meses;
- Não ter diagnóstico médico de diabetes ou outras doenças endócrinas;
- Não ter história clínica de doença gastrointestinal ou distúrbios endócrinos;



- Não estar a tomar medicamentos que interfiram com o metabolismo glicídico ou lipídico;
- Não ter estado internado nos últimos 3 meses;
- Não estar grávida ou a amamentar;
- Não ser fumador;
- Não ser vegetariano;
- Efetuar regularmente a refeição do pequeno-almoço.

Estes critérios serão avaliados em entrevista prévia onde também será determinado o seu peso e altura.

Caso preencha os requisitos definidos é um candidato a participar neste estudo. A sua participação é voluntária e poderá abandoná-lo a qualquer momento. Se alguma das condições acima descritas se alterar durante o decurso do estudo, deverá informar o responsável pelo trabalho que avaliará a situação.

Como participante no estudo ser-lhe-á pedido que colabore em duas sessões (se apresenta IMC > 24,9) ou quatro sessões (se apresenta IMC entre 18,5 e 24,9). As sessões deverão ser intervaladas em pelo menos uma semana.

No dia antes de cada ensaio deverá evitar exercício físico intenso, ingestão de álcool e ingestão de alimentos especialmente ricos em fibra na refeição do jantar (cereais integrais e hortícolas em abundância). É também recomendado que a refeição do jantar na véspera dos dias dos ensaios seja o mais semelhante possível e realizada por volta das 20.00 horas. Não deverá comer ou beber desde o jantar até ao ensaio.

As duas sessões comuns a todos os participantes constam de uma refeição teste (pequeno-almoço após o jejum noturno) constituída por uma dose de pão (uma das sessões inclui pão tradicional e a outra, pão com elevado teor em amido resistente) e 250 ml de água. Antes da refeição teste ser-lhe-á pedido que preencha uma escala visual analógica de avaliação da sensação de apetite e serão recolhidas duas amostras de sangue capilar por picada no dedo. De seguida é servida a refeição teste que deve

terminar entre 12 a 15 min. O procedimento de preenchimento da escala visual e de recolha de amostras de sangue capilar é repetido aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Em todas as amostras de sangue é determinada a glicémia.

Se o seu IMC se situa entre 18,5 e 24,9 deverá ainda participar em duas sessões, semelhantes às anteriores, sendo que a dose de pão e água é substituída por uma solução de 50g de glicose em 250 ml em água. Estas duas sessões são exatamente iguais entre si.

Os dados pessoais dos participantes não serão nunca revelados sendo o registo dos dados efetuado sob a forma de um código que lhe será atribuído. Os investigadores que têm acesso aos seus dados pessoais estão sujeitos a sigilo profissional.

Não haverá qualquer custo ou pagamento inerentes à participação neste estudo.

Para participar no estudo deverá assinar o Termo de Consentimento Informado anexo ao presente documento.

Muito obrigada pela sua disponibilidade.

Olga Amaral

Investigador responsável pelo estudo

## APÊNDICE 4

### CONSENTIMENTO INFORMADO

**Projeto:** Efeito da ingestão de pão de trigo com elevado teor em amido resistente na resposta glicémica

Assegura-se a anonimização dos dados pessoais bem como a confidencialidade dos resultados obtidos.

Poderá, a qualquer momento, retirar a sua permissão para participar no estudo, sem quaisquer consequências.

Fui informado dos objetivos do estudo, compreendi o que me foi explicado e aceito participar no estudo.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do participante

Olga Maria Reis Pacheco Almeida Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do Investigador responsável

Contacto: 966823792

## APÊNDICE 5

### QUESTIONÁRIO SOBRE AVALIAÇÃO DA SENSÇÃO DE APETITE ESCALA VISUAL ANALÓGICA

NOME: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2015

( ) 0min ( ) 15min ( ) 30min ( ) 45min ( ) 60min ( ) 90min ( ) 120min

	Quão satisfeito se sente?	
Nada satisfeito	_____	Totalmente satisfeito
	Quanta fome sente agora?	
Não tenho fome nenhuma	_____	Nunca tive tanta fome
	Quão cheio se sente?	
Completamente vazio	_____	Não consigo comer mais nada
	Quanto acha que conseguiria ainda comer?	
Absolutamente mais nada	_____	Muito

## **ANEXO 1**